

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Ecología



TESIS DOCTORAL

**Evaluación y criopreservación de espermatozoides como
herramienta para la conservación de felinos amenazados :
aplicación en el caso del lince ibérico, ("Lynx pardinus")**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Natalia Gañán Mejías

DIRECTORES:

Eduardo, dir Roldán Schuth
Montserrat, dir Gomendio Kindelan

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



T599.74(460)
GAN
eva

Departamento de Ecología
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid

Museo Nacional de Ciencias Naturales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

**EVALUACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COMO
HERRAMIENTA PARA LA CONSERVACIÓN DE FELINOS AMENAZADOS.
APLICACIÓN EN EL CASO DEL LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*).**

Memoria presentada por **Natalia Gañán Mejías** para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Dirigida por **Eduardo Roldán Schuth** y **Montserrat Gomendio Kindelan**,
Profesores de Investigación, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).

La Doctoranda

Natalia Gañán

VºBº del Director

Eduardo Roldán

VºBº del Director

Montserrat Gomendio

Madrid, Mayo de 2009.



**EVALUACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COMO
HERRAMIENTA PARA LA CONSERVACIÓN DE FELINOS AMENAZADOS.
APLICACIÓN EN EL CASO DEL LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*)**

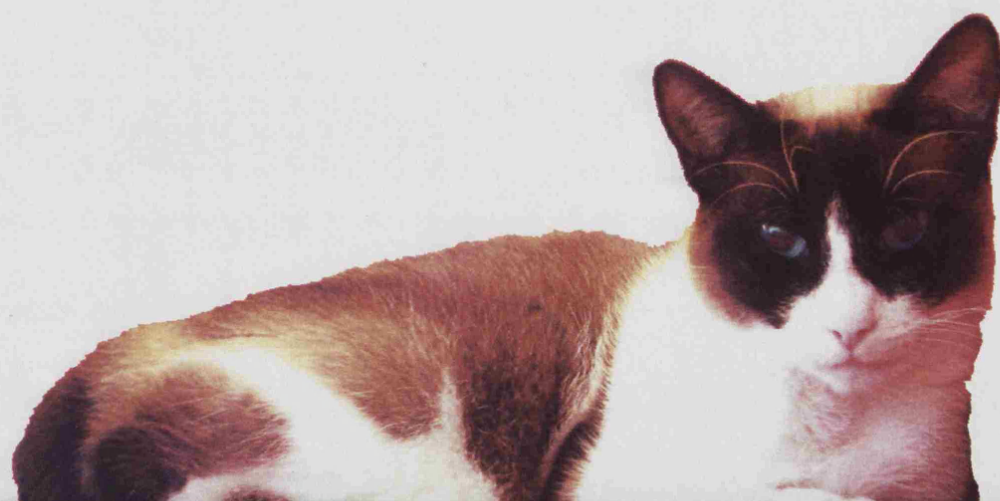
Natalia Gañán Mejías. Tesis doctoral 2009
Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción
Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC

A mis padres,
Juan José y Mari Luz.

Índice

○ Agradecimientos.....	1 – 4.
○ Resumen general.....	5 – 9.
○ Introducción general.....	11 – 42.
○ Objetivos.....	43 – 44.
○ Capítulo 1: Factores que afectan al éxito de la congelación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico (<i>Felis catus</i>).....	45 – 92.
○ Capítulo 2: Efecto del almacenamiento de epidídimos de gato domestico (<i>Felis catus</i>) a 5°C sobre la calidad y la criopreservación espermáticas.....	93 – 108.
○ Capítulo 3: Características reproductivas del macho, criopreservación de semen y fecundación <i>in vitro</i> heteróloga en el lince rojo (<i>Lynx rufus</i>).....	109 – 128.
○ Capítulo 4: Rasgos reproductivos del macho del lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>)...	129 – 150.
○ Capítulo 5: Valoración de la calidad del semen, criopreservación de espermatozoides y fecundación <i>in vitro</i> heteróloga en el lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>).....	151 – 173.
○ Discusión general.....	175 – 183.
○ Conclusiones.....	185 – 187.
○ Referencias bibliográficas.....	189 – 202.
○ Anexo I: Funcionamiento y puesta a punto de un sistema programable de refrigeración de espermatozoides.....	203 – 206.
○ Anexo II: Fotos.....	207 – 212.
○ Anexo III: Publicaciones.....	213 – 214.

Agradecimientos



Llevar a cabo esta tesis no hubiese sido posible de no haber sido por la ayuda de mucha gente. Unos han colaborado directamente en el trabajo, otros me han apoyado personalmente y algunos me han regalado las dos cosas, su trabajo y su amistad.

Agradezco a mis directores de tesis Eduardo Roldán y Montserrat Gomendio por su apoyo, desde la primera vez que entré en su despacho en 2004, y por todo lo que he aprendido de ellos desde entonces. Me ofrecieron la oportunidad de incorporarme a su equipo de investigación y de trabajar en un proyecto que les había costado mucho tiempo conseguir, la creación de un Banco de Germoplasma de Especies Amenazadas (BanGES). También les estoy muy agradecida por permitir mi estancia en el Conservation and Research Center (CRC), en Estados Unidos, que es un centro de referencia mundial en la conservación de felinos.

Agradezco enormemente la ayuda y apoyo de muchos compañeros del Museo de Ciencias Naturales y de fuera de él. A Cristina, Raquel G., Ana, Lucía, Begoña, Mari Jose, Laura, Alberto, Pepe, Juan, Elvira, Raquel L. y Aurelio, porque a lo largo de estos años y de una forma u otra hemos sido un equipo. A Ana por todo lo que me enseñó en el laboratorio cuando empecé la tesis, por la puesta a punto de las técnicas de tinción de espermatozoides, por colaborar en el trabajo de campo y por sus fotos. A Raquel G. por todo lo que me ha enseñado sobre oocitos y fecundación. A Lucía por su ayuda durante las electroeyaculaciones y el trabajo de laboratorio en la campaña del año 2005. A Eva Martín Becerra, Sandra Prol Rollán, Adrián Sestelo y Bego por ayudarme en la recogida de muestras de las clínicas y su traslado al laboratorio. A Bego también por todo su trabajo en el BanGES. A Cris, especialmente, por acompañarme y ayudarme siempre, dentro y fuera del Museo, desde la recogida y procesamiento de muestras que nos ha hecho cambiar de planes tantos sábados, hasta los cafés y los largos en la piscina de Pradillo. A Almu por sus conversaciones y al resto de compañeros del Museo por ayudarme, hacerme reír y compartir estos años conmigo: Estrella, Sonia, Yolanda, Gema, Yudith, Elena, Gustavo, Luisa, Conchi, Montse, Marianne, Oscar, Camila, Josué y Rafa. A Isa y Eli por ser las mejores compañeras de cursos de doctorado y estadística que se pueda tener y por compartir trufas, sidra y lo que haga falta allí donde nos pille. Eli mil gracias por darme asilo en Cerceda y enseñarme y apoyarme tanto.

Fuera del Museo también ha habido mucha gente que me ha ayudado directa o indirectamente a conseguir esta tesis. Agradezco a David Wildt, JoGayle Howard, Rachel Santymire y Katharine Pelican (todos ellos del CRC-Smithsonian Institution) por su ayuda en el aprendizaje de las técnicas de recogida de semen y evaluación de espermatozoides en felinos. A las sociedades protectoras de animales y clínicas veterinarias de Madrid (VETPA-ANAA, SPAP-refugio, Alberto Alcocer, Alonso Cano, Arco Iris, Ayala, Capacés, Castellana,

CIACAM, Gattos, Mediterraneo, Pío XII, Puerta de Toledo, Ramón y Cajal, Retiro, Ventas, Urbano) por la provisión de muestras de gato doméstico, especialmente a Pablo, Amaya, Juan, Patricia y Marcos de VETPA, a José Luis de SPAP, a Juanjo de Ventas y Santiago de Gattos por su interés en mi proyecto. A los técnicos del Zoobotánico de Jerez, especialmente a José María Aguilar e Íñigo Sánchez por ofrecernos sus bobcats al principio de todo, y también a Mariano Cuadrado, Miguel Ángel Quevedo y Luis Flores por su trabajo y apoyo logístico durante las maratónicas jornadas de trabajo en el Zoo. A Astrid Vargas por confiar en nuestro equipo y recibirnos en el Acebuche siempre con los brazos abiertos. A Fernando Martínez por su trabajo y las invitaciones a fiestas varias. A todas las personas de los centros de cría en cautividad del lince ibérico, "el Acebuche" y "la Olivilla" por su trabajo y ayuda: María José Pérez-Aspa, Juana Bergara, Luis Díez Klink, José Rodríguez, David Rodríguez, Antonio Rivas, Tasio Vázquez, Antonio Herrera, Olga Jiménez, Luna Puentes, David Rodríguez, Clara Isabel León. A Toñe también por las fotos de los lince ibéricos. A Clari también por brindarnos su propia casa para alojarnos durante los chequeos en noviembre de 2008. A Isabel Molina, Nuria Viqueira, Cristina Martínez y Guillermo López por su participación en las anestias de los lince ibéricos y en la toma y envío de muestras de animales del campo vivos y muertos. A Álvaro Muñoz, Irene Zorrilla y todo el personal de los CAD de Sevilla y Málaga por su trabajo en las necropsias y en la toma y envío de las muestras al MNCN. A Paco Palomares por ofrecernos la colaboración en un proyecto que nos permitió trabajar con los lince ibéricos libres en Doñana en diciembre de 2006. A José Vicente López-Bao, Juan Carlos Revilla, Leo Fernández y Marcos López por las capturas de estos animales y a Sandra Bañuls por su apoyo en las anestias de los mismos. A Julian Garde por su participación en el trabajo de campo y su predisposición a ayudarme. A Jordi Colas por sus fotos en el Zoo de Jerez en diciembre de 2008. A los centros zoológicos de Barcelona, Valladolid, Guadalajara y Almería y al centro de Recuperación de Especies Amenazadas de "los Hornos" en Cáceres por permitirnos trabajar con los lince euroasiáticos, aunque no haya podido reflejar el trabajo realizado con ellos en esta tesis.

A todos mis amigos de fuera del Museo por darme la vida que necesito aparte de mi trabajo. A Natalia por aprenderse muy bien la lección de la criopreservación espermática pese a no ser mujer de ciencias. A Raquel, por estar tan orgullosa de mi y darme tanta confianza. A Nuria, Luis y Rubén por ser mi segunda familia casi desde el principio y casi hasta el final de la tesis. Gracias por las risas, las empanadas, los viajes, los "Crustis". Nuri ha sido mi RRPP, me llevó por primera vez a ANAA para que les presentara mi proyecto de tesis y pedirles que tomaran muestras para mi y hasta ha recogido muestras ella misma alguna que otra vez. A Pipa, Gata, Kira y Chati por su visión cuadrúpeda de la vida en Béjar. A Pipi además por ayudarme a revisar la tesis. A Irene, David y Luisito por ser también parte de esa familia. A Dani por gamberro. A Pirulo por buscar otros mundos posibles. A Sergio

por hacernos reír a costa del electroeyaculador y por las fotos de Sierra Morena. A Maño por acercarme a Asia. A Jorge por ayudarme en todo lo que me dejé. A Guada por preocuparse por cómo se acercaba el final de la tesis y darme ánimos. Al resto de amigos a los que habré aburrido muchas veces hablándoles de espermatozoides y gatos por aguantarlo: Amaya, Chesca, Maria Santamaría, Maria Polo, Sandra, Toni, Mar P., Mar T., Ester, Sole, Isabel, Pablo, Nacho, Carlos, Dani "G", Pepe y Latorre.

A toda mi familia. Especialmente a mis padres Juan y Mari Luz por su apoyo incondicional. A Ana y Jorge, tío Tini, Nati, Lucía, Agustín, Paquito, tío Eduardo y mis yayos por su cariño. A Dori, Benito, Sara, Carlos, Jorge, Paloma, Albita, Guada y Jose por hacer crecer mi familia. A Víctor por aguantarme pacientemente de buen y de mal humor y por las cosquillas.

Gracias a todos.

La financiación para el desarrollo de este trabajo se ha obtenido del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y la Fundación BBVA. Se agradece a Novauto (Ford Motor Co., España) la cesión de un vehículo para el trabajo de campo, y a Borja Heredia y Miguel Aymerich del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y a Miguel Ángel Simón de la Junta de Andalucía, el apoyo para la realización de este trabajo.

Resumen General



El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es el felino más amenazado del mundo y es la única especie de la familia Felidae considerada en peligro crítico (IUCN 2008). Sus poblaciones han alcanzado tamaños tan reducidos que su viabilidad está amenazada, lo cual unido a los bajos niveles de variabilidad genética hacen a estas poblaciones muy vulnerables frente a la acción conjunta de factores ambientales y demográficos. En una situación como ésta es necesario llevar a cabo medidas complementarias de conservación *in-situ* y *ex-situ*, entre ellas la cría en cautividad, el desarrollo de bancos de recursos biológicos y el uso de técnicas de reproducción asistida (ARTs). En 2003 se puso en funcionamiento el programa de Cría en Cautividad del Lince Ibérico y el Banco de Germoplasma y Tejidos de Especies Silvestres (BanGES) y se iniciaron líneas de investigación para el desarrollo de ARTs de aplicación al lince ibérico. La investigación desarrollada ha incluido la recogida de material reproductivo (especialmente espermatozoides) y somático, la caracterización de parámetros reproductivos y la criopreservación espermática en la propia especie y la realización de experimentos de criopreservación espermática en especies utilizadas como modelo, el gato doméstico (*Felis catus*) y el lince rojo (*Lynx rufus*).

En un primer estudio se han evaluado algunos factores del proceso de criopreservación espermática con espermatozoides epididimarios de gato doméstico. Se ha examinado la eficacia de la criopreservación analizando la motilidad (mediante el uso de un índice de motilidad espermática, SMI) y la integridad acrosómica (%IA) antes y después de la congelación empleando (a) 2 diluyentes: TEST y Biladyl, (b) 2 tasas de refrigeración: rápida en 30 min (-0,5°C/min) y lenta en 120 minutos (-0,125°C), (c) 2 sistemas de añadido del glicerol: en 1 vez y en 3 etapas, (d) 2 sistemas de almacenamiento: píldoras sobre hielo seco (CO₂ sólido) y pajuelas sobre vapores de nitrógeno, (e) 2 sistemas de rellenado de las pajuelas: a temperatura ambiente antes de la refrigeración y a 5°C después de la misma, y (f) 2 sistemas de congelación de pajuelas con 2 tasas de congelación: en 1 y 2 niveles sobre vapores de nitrógeno. Además, se ha evaluado la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides criopreservados, incluyendo un análisis de la eficacia de 2 métodos de estimulación de la motilidad (el "swim-up" y el añadido de pentoxifilina), sobre la tasa de fecundación *in vitro*.

Se encontraron resultados significativamente mejores de SMI a la descongelación cuando el semen se almacenó en pajuelas, y empleando congelación en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno. A su vez, se observó un resultado significativamente más alto de SMI durante la incubación post-descongelación cuando el glicerol se añadió en 3 etapas. No se encontraron diferencias significativas en SMI ni %IA cuando se analizaron los demás factores. Se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre las proporciones de

espermatozoides móviles y con el acrosoma intacto (%IA) en fresco y post-descongelación, y entre %IA y el % de espermatozoides normales. La utilización de swim-up mejoró significativamente la proporción de espermatozoides móviles post-descongelación, pero no supuso un incremento significativo de la tasa de fecundación *in vitro*. El diluyente de congelación TEST proporcionó una tasa media de fecundación similar a la obtenida con espermatozoides frescos.

En un segundo estudio se utilizaron espermatozoides epididimarios de gato doméstico mantenidos en refrigeración en los epidídimos hasta 4 días (72 h) para analizar (a) el efecto del tiempo de almacenamiento de los epidídimos *post mortem* sobre la calidad espermática y la supervivencia después de la criopreservación, (b) el efecto de diferentes tiempos de exposición al crioprotector antes de la congelación sobre la calidad espermática post-descongelación y (c) el efecto de ambos, tiempo de almacenamiento y de exposición, sobre la longevidad espermática post-descongelación.

Se encontraron diferencias significativas en el SMI de las muestras recién extraídas debidas al tiempo de almacenamiento de los epidídimos. El SMI de las muestras justo después de la extracción de los epidídimos disminuyó significativamente a partir de las 48 h de almacenamiento con respecto a las muestras control. Además el valor de SMI post-descongelación observado en las muestras control fue significativamente mayor que el visto en las muestras procedentes de epidídimos almacenados 24, 48 ó 72 h. Por otra parte, cuando los epidídimos se almacenaron durante 72 h antes de la recolección y criopreservación de los espermatozoides, se detectaron diferencias significativas entre las muestras con tiempos diferentes de equilibrado con el glicerol diferentes (30 vs 120 min) en la evaluación post-refrigeración, registrándose un %IA significativamente mayor cuando se dejaron los espermatozoides en contacto con el crioprotector durante 120 min. Después de descongelar, hubo diferencias significativas tanto en el %IA como en el SMI, alcanzándose valores más altos en las muestras espermáticas equilibradas durante 120 min. Se encontró relación significativa entre las proporciones de espermatozoides móviles y con el acrosoma intacto post-descongelación en todos los grupos experimentales estudiados.

En tercer lugar, utilizando como modelo el lince rojo, una especie más cercana al lince ibérico que el gato doméstico se (a) caracterizaron los parámetros seminales de esta especie, (b) analizó la capacidad de estos espermatozoides de sobrevivir *in vitro*, (c) valoraron dos diluyentes de congelación (TEST vs Biladyl) para la criopreservación de espermatozoides de esta especie, examinando la motilidad y la integridad acrosómica, y (d) evaluó la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados de lince rojo mediante fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico.

El lince rojo resulta ser una especie moderadamente estacional, encontrándose diferencias significativas en muchos parámetros básicos de las muestras espermáticas

recogidas en otoño o en primavera, pero sin dejar de producir espermatozoides una vez finalizada la época de estro de las hembras. Presenta características del eyaculado inferiores a las observadas en otros felinos de mediano tamaño, incluidas otras especies de lince como el ibérico y el euroasiático, destacando la proporción de espermatozoides anormales, que es la más alta de las tres especies y con excepción del número total de espermatozoides que es mayor en el lince rojo que en las otras dos especies. Se observó que las muestras criopreservadas en Biladyl experimentan un descenso significativo de la proporción de acrosomas intactos post-descongelación, con respecto a las muestras en fresco y que este descenso no tiene lugar de forma tan pronunciada en las muestras conservadas en TEST. Se encontró relación significativa entre el %IA (en fresco y post-descongelación) y el SMI después de la descongelación. Se hallaron diferencias en las tasas de fecundación medias obtenidas con espermatozoides criopreservados recogidos en otoño o en primavera, siendo sustancialmente mayores las segundas. También se observaron diferencias muy marcadas en las tasas de fecundación medias de las muestras criopreservadas en TEST y Biladyl, resultando muy superiores las primeras. Resultan muy interesantes las relaciones significativas encontrada entre el %IA post-descongelación y las proporciones de oocitos fecundados y divididos.

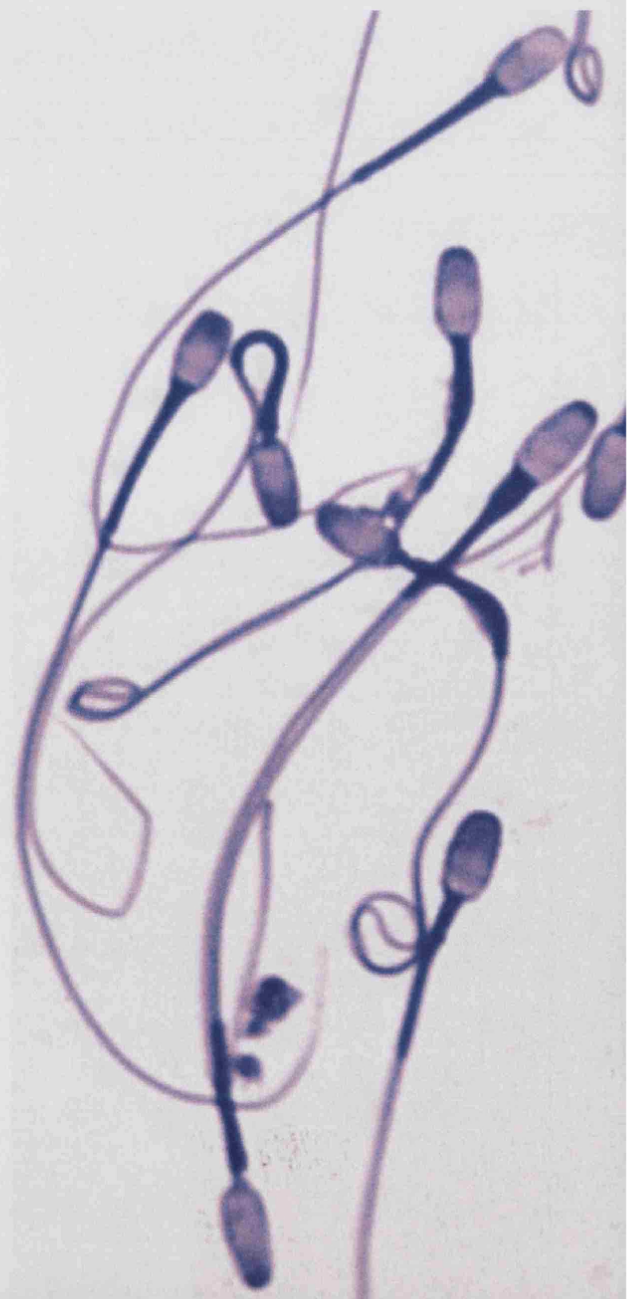
En cuanto al trabajo realizado con la especie objetivo de esta tesis, el lince ibérico, se realizaron los siguientes trabajos: (a) caracterización de parámetros seminales, (b) valoración del efecto de la edad sobre la calidad seminal, (c) comparación de parámetros espermáticos entre machos cautivos y en libertad, (d) examen de las relaciones entre caracteres espermáticos, (e) comparación de las características reproductivas del macho antes y después de la época de cría, (f) comparación de parámetros en espermatozoides eyaculados y epididimarios, (g) valoración las posibles relaciones entre características seminales y fertilidad del macho, (h) análisis de la capacidad de los espermatozoides de sobrevivir en varias condiciones de incubación *in vitro*, (i) valoración de métodos de criopreservación, evaluando el efecto sobre la motilidad y la integridad acrosómica, y (j) evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados usando fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico.

Se han observado en esta especie características testiculares, endocrinas y seminales inferiores a las observadas en otros felinos de mediano tamaño, pero dentro del rango de variación observado en otras especies de lince como el lince rojo y el euroasiático. Los machos de lince ibérico no alcanzan la madurez sexual plena hasta que superan los 3 años de edad, observándose diferencias significativas en variables fenotípicas, hormonales y espermáticas con valores superiores en los machos >3 años de edad. No existen diferencias destacables entre las muestras seminales procedentes de individuos cautivos o en libertad, ni entre muestras obtenidas antes (otoño) o después

(primavera) de la época de cría, ni entre espermatozoides eyaculados de animales vivos o epididimarios de animales muertos. Además se ha descubierto la existencia de asociación significativa entre parámetros del eyaculado como el % de acrosomas intactos con el % de espermatozoides móviles y con el % de espermatozoides normales, y de rasgos fenotípicos o seminales con la fertilidad de los machos del programa de cría en cautividad. Hubo correlación significativa entre el peso relativo de testículos de los machos y el número medio de cópulas con la primera hembra con la que copuló. También se observó correlación significativa entre el número total de espermatozoides en el eyaculado y el número de cópulas con la primera hembra con la que se apareó. Las características del semen se relacionaron además con el número de cachorros por hembra, como se puso en evidencia al comparar las hembras que parieron 2 y 3 cachorros, respectivamente, dado que los machos que dieron lugar a mayor número de cachorros produjeron un número de significativamente mayor de espermatozoides en el eyaculado, una mayor motilidad y una mayor proporción de espermatozoides con acrosoma intacto en el eyaculado. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de espermatozoides móviles o con acrosoma intacto entre las muestras incubadas en medios F-10 de Ham o TCM-199, ni entre las muestras criopreservadas en TEST o Biladyl con 4% de glicerol. Los espermatozoides de lince ibérico fueron capaces de fecundar oocitos de gata doméstica *in vitro*. La tasa media de fecundación *in vitro* con espermatozoides de lince ibérico criopreservados en TEST fue más del doble que la obtenida con espermatozoides criopreservados en Biladyl.

Estos estudios nos han permitido obtener avances importantes en la caracterización de parámetros reproductivos de felinos modelo y del lince ibérico, una especie críticamente amenazada. Los resultados obtenidos han demostrado la posibilidad de criopreservar exitosamente espermatozoides de esta especie y de emplear pruebas *in vitro* para examinar la capacidad fecundante. Se han sentado así las bases para un mejor conocimiento de la reproducción de esta especie y se han dado los primeros pasos en el desarrollo de técnicas de reproducción asistida para contribuir a la conservación de esta especie emblemática.

Introducción General



Actualmente está teniendo lugar la primera extinción de especies a gran escala desde finales del Cretácico, hace 65 millones de años. A diferencia de las 5 extinciones masivas pasadas, que fueron el resultado de cambios climáticos catastróficos, colisiones de cuerpos extraterrestres, envenenamiento atmosférico y vulcanismo hiperactivo, la actual puede atribuirse principalmente a la acción de la especie humana, mediante la destrucción y fragmentación de hábitats y la sobreexplotación de algunas especies. En los últimos 50 años la presión del hombre ha sido tan intensa que sus efectos han empezado a notarse a escala planetaria. Según datos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), el 38% de todas las especies animales y el 21% de los mamíferos se encuentran amenazados (IUCN 2008).

El agravante de esta crisis de biodiversidad es la velocidad a la que está teniendo lugar. Se calcula que la tasa actual de extinción de especies puede ser unas 1.000 veces superior a la tasa de extinción biológica histórica, estimada en base a los datos disponibles para aves y mamíferos, que son los grupos taxonómicos mejor conocidos (Wilson 1992, 2002).

La destrucción del hábitat que todavía hoy continúa es el principal factor de reducción de biodiversidad debido a que, aunque existan porciones disponibles de hábitat original, la pérdida de potenciales áreas de dispersión y el cierre de corredores migratorios (para algunas especies) genera poblaciones fragmentadas.

Poblaciones pequeñas y fragmentadas. Extinción de especies

Desde que se sentaron las bases de la biogeografía de islas (MacArthur y Wilson 1967), se han construido varios modelos sobre el tamaño de población y el tamaño del área mínimos necesarios para la supervivencia de una especie. Cuando una población disminuye por debajo de un determinado tamaño, conocido como mínimo para una población viable (MVP), su recuperación es imposible, de modo que este MVP es considerado normalmente como el umbral de extinción para una población o una especie (Frankham 1995). Existen tres factores que tienden a reducir el tamaño de la población: la estocasticidad demográfica, la estocasticidad ambiental y la pérdida de diversidad genética, que normalmente actúan en conjunto. La combinación de la actuación de estos factores en poblaciones de pequeño tamaño las conduce a un declive acelerado y muy pronunciado conocido como "vórtice de extinción".

La estocasticidad demográfica está relacionada con las tasas de natalidad y mortalidad de los individuos de una especie. A medida que disminuye el tamaño de la población, el efecto de la reproducción y la supervivencia de cada individuo tiene efectos desproporcionados sobre la dinámica poblacional, que en algunos casos pueden impedir su

recuperación. Estos efectos son particularmente marcados cuando las tasas de nacimientos son bajas ya que sus poblaciones requieren de más tiempo para recuperarse, como por ejemplo después de la epizootia de leucemia felina (FeLV) en la población de lince ibérico de Doñana en el año 2007 (Meli *et al.* 2009).

La estocasticidad ambiental está causada por cambios que ocurren al azar en el clima y en el suministro de comida, así como por desastres naturales como incendios, inundaciones o sequía. En poblaciones confinadas a áreas pequeñas, una sola sequía, viento o incendio, podría eliminar a todos los individuos.

A escala de población la pérdida de variabilidad genética limita la capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes (reduce su rango de respuesta a estos cambios) y de colonización de hábitats diferentes. La viabilidad de una población depende en última instancia de la capacidad de los individuos que la componen para sobrevivir y reproducirse. A escala individual la variabilidad genética es producto de la similitud genética (parentesco) de los progenitores. Cuando una población es pequeña aumentan los cruces entre parientes, es decir, la consanguinidad, lo cual conlleva una reducción de eficacia biológica de los individuos, que se traduce en la disminución de la reproducción y la supervivencia. A este fenómeno se le denomina depresión por consanguinidad (Charlesworth y Charlesworth 1987), frecuente en muchas poblaciones pequeñas y aisladas, y que constituye un obstáculo sustancial a su recuperación. La consanguinidad provoca un incremento de la homocigosidad que es perjudicial porque aumenta la probabilidad de que se expresen alelos deletéreos recesivos (Charlesworth y Charlesworth 1999). La magnitud de la depresión por consanguinidad depende fuertemente de las condiciones ambientales, ya que el estrés ambiental puede exacerbar los efectos de la consanguinidad sobre la eficacia biológica (Keller *et al.* 2002). Con respecto a los machos se observa que los individuos más consanguíneos sufren una disminución drástica de la calidad del semen, principalmente por aumento de la proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas y la disminución de la motilidad, que resultan esenciales para la fecundación (Gomendio *et al.* 2000).

La problemática de los felinos. El caso del lince ibérico (*Lynx pardinus*)

La familia Felidae es uno de los grupos con mayor diversidad dentro del orden de los carnívoros (Carnivora). Está constituida por 11 géneros y 36 especies salvajes (Johnson *et al.* 2006) (Fig. 1), diversas en muchos aspectos. Son muy variables en tamaño, incluso dentro de una misma especie, como ocurre con los leopardos (*Panthera pardus*) o los pumas (*Puma concolor*). Hay especies desde 1 kg, como el gato rojizo (*Prionailurus rubiginosus*), hasta cerca de 300 kg, como el tigre (*Panthera tigris*) (Sunquist y Sunquist 2002). También son muy diferentes en pelaje, que puede ser de coloración uniforme como

en el león (*Panthera leo*), el puma y el yaguarundi (*Puma yagouaroundi*), manchado como en la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) y el gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*), moteado como en el leopardo (*Panthera pardus*) y el guepardo (*Acinonyx jubatus*), con rosetas como en el jaguar (*Panthera onca*) o el ocelote (*Leopardus pardalis*), o a rayas como en el tigre o el gato andino (*Leopardus jacobita*). Estas diferencias son resultado de la adaptación de cada especie al hábitat que ocupa, con el objetivo de mimetizarse y hacer pasar desapercibido al individuo ante potenciales presas y predadores. Presentan además diferencias de nicho ecológico ya que, aunque la mayoría de ellos habitan en zonas de bosque o colindantes al bosque, ocupan una gran variedad de hábitats diferentes (Sunquist y Sunquist 2002). Por otra parte, junto a todas las diferencias mencionadas que hacen de la familia de los felinos un grupo diverso, también poseen rasgos comunes, como son la alimentación, estrictamente carnívora, a base de carne de presas vivas que cazan, o la morfología corporal, reflejo de su dieta, que se caracteriza por presentar patas delanteras fuertes, con garras de largas uñas retráctiles con las que se ayudan para cazar, una columna vertebral flexible y unas patas traseras musculosas que se combinan con todo lo anterior para conferirles rapidez y agilidad. Sus ojos, muy grandes y sensibles a la luz, poseen buena visión periférica y binocular que les confieren la capacidad de cazar en condiciones de alta luminosidad y casi completa oscuridad y amplia visión espacial, y a los que acompañan agudos sentidos del oído y el olfato. También destaca su dentición, que presenta cuatro potentes caninos que insertan entre las vertebrae de sus presas para darles muerte. El comportamiento social les caracteriza como animales más o menos solitarios, debido a las grandes superficies necesarias para que haya suficientes presas. Los adultos viven y cazan solos, excepto los machos de león y guepardo. Son bastante intolerantes con otros adultos de su mismo sexo y exhiben un sistema social espacial y temporalmente disperso (Bekoff *et al.* 1984), que les vuelve especialmente vulnerables ante la destrucción y fragmentación del hábitat y la estocasticidad demográfica. De las 36 especies de felinos silvestres existentes en el mundo, 24 (67%) están amenazadas debido a la destrucción y fragmentación de sus hábitats, por la disminución/desaparición de presas y en algunos casos por la caza intensiva de la que son objeto para conseguir su piel o sus colmillos o para evitar el riesgo que suponen para los animales domésticos y ocasionalmente para los asentamientos humanos (Inskip y Zimmermann 2009).

Se consideran gatos pequeños aquellos que en edad adulta pesan menos de 20 kg (Swanson 2006) y constituyen este grupo 29 de las 37 especies. Entre ellas se encuentran los linces, taxonómicamente englobados en el género *Lynx*, formado por 4 especies (Fig. 1). Las especies de lince ocupan hábitats diferentes pero comparten rasgos comunes que los diferencia del resto de los felinos, como la longitud de la cola, que en el resto mide de un tercio a la mitad de la longitud cabeza-cuerpo (García-Perea 1992) y cuerpo corto en

relación a unas extremidades estilizadas en lugar de cuerpo alargado y extremidades cortas habitual en otras especies de felinos (Palomares 2004).

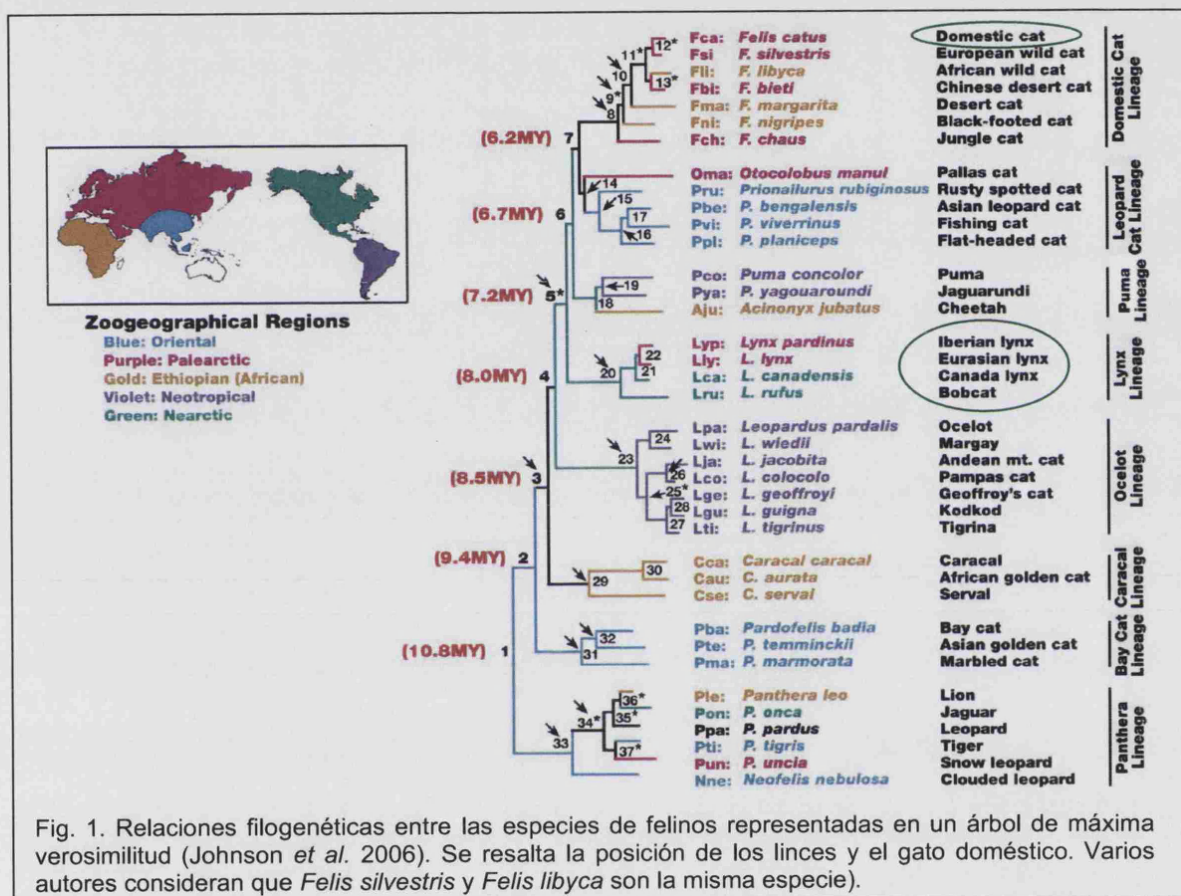
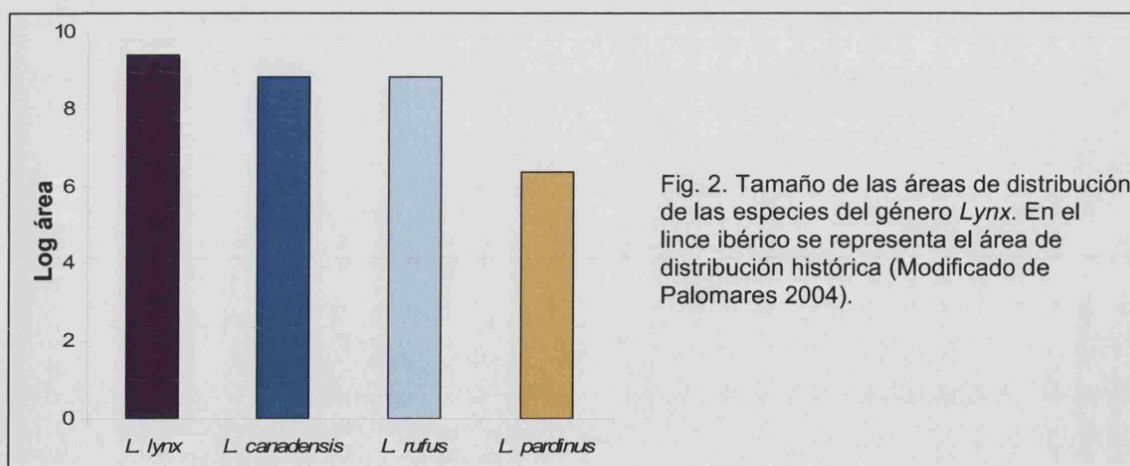


Fig. 1. Relaciones filogenéticas entre las especies de felinos representadas en un árbol de máxima verosimilitud (Johnson *et al.* 2006). Se resalta la posición de los lince y el gato doméstico. Varios autores consideran que *Felis silvestris* y *Felis libyca* son la misma especie).

De las cuatro especies de lince, dos se distribuyen por el continente americano, el lince canadiense (*Lynx canadensis*) y el lince rojo (*Lynx rufus*), y las otras dos por Asia y Europa, el lince euroasiático o boreal (*Lynx lynx*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Sunquist y Sunquist 2002). Todos ellos tienen un antecesor común que se separó de las otras especies de felinos hace 6 millones de años (Johnson y O'Brien 1997). El antecesor más aceptado de todos ellos es *Lynx issidorensis*, que se originó en África hace 4 millones de años y se distribuía por Asia y Europa hace 2 millones de años (Kurtén 1978, Werdelin 1981). Otros investigadores consideran que el origen de los lince actuales está en *Felis rexroadensis*, cuyos restos fosilizados se han encontrado en Norteamérica (Sunquist y Sunquist 2002), donde sitúan el origen del género. El lince rojo fue el primer linaje en diferenciarse (Johnson *et al.* 2004, 2006). Las relaciones entre las otras 3 especies están todavía poco claras y varían en función del método de análisis utilizado (Johnson *et al.* 2004). La mayoría de los estudios apuntan a que el lince Ibérico y el euroasiático fueron taxones hermanos que compartían un antecesor común con el lince canadiense (Johnson *et*

al. 2004), aunque algunos autores dan como taxones hermanos al lince ibérico y canadiense (Beltrán *et al.* 1996). Parece que la especiación o divergencia de estas 3 especies a partir de un ancestro común ocurrió simultáneamente hace 1,53 - 1,68 millones de años (Johnson *et al.* 2004).

Algunos investigadores han propuesto que el lince ibérico es una subespecie de lince boreal y no una especie plena, pero hay resultados moleculares que confirman su entidad específica (Johnson *et al.* 2004). El lince ibérico y el euroasiático se distribuían en Europa central en el Pleistoceno (Kurtén y Grandqvist 1987) pero puede que nunca haya habido solapamiento significativo de sus áreas de distribución (Johnson *et al.* 2004) y no hay evidencias de formas intermedias (Werdelin 1981). Las áreas de distribución y los tamaños poblacionales de ambas especies se han reducido significativamente durante los dos últimos siglos (Johnson *et al.* 2004). El área de distribución del lince euroasiático es una de las más grandes de todos los felinos, superando los 13 millones de km², muy superior al área máxima (histórica) de distribución del lince ibérico (Fig. 2), estimada en 40.000 km² (Rodríguez y Delibes 2004). Mientras que el área ocupada en la actualidad por el lince euroasiático sólo ha sufrido pérdidas en Europa central y occidental, la distribución del lince ibérico ha experimentado un proceso de fuerte contracción desde principios del siglo XX (Fig. 4), reduciéndose casi a la mitad en la actualidad, con área de 22.300 km² (Rodríguez y Delibes 2004).



El lince ibérico (*Lynx pardinus* Temminck 1824) es especialista en cuanto a hábitat, pues selecciona zonas de matorral y bosque mediterráneo siempre que haya abundancia de conejo (Blanco 1998), resultando óptimos los ambientes heterogéneos donde se desarrolle poca actividad humana, con mosaico de matorral mediterráneo más o menos denso donde esconderse y encamarse y zonas abiertas de pasto donde cazar y por donde desplazarse. Es también especialista trófico constituyendo el conejo de monte europeo (*Oryctolagus cuniculus*) del 75 al 100% de su dieta (Aldama *et al.* 1991) (Fig. 3), dependiendo de la

disponibilidad de esta presa. La necesidad energética diaria de un individuo adulto se estima en 600-1000 kcal, lo cual está muy próximo al aporte energético que representa la ingesta de un conejo (Aldama *et al.* 1991). Por lo tanto, aunque no se ha encontrado correlación significativa entre la reproducción de lince ibéricos y la abundancia de conejos, su presa principal (Palomares *et al.* 2005), a nivel de población la densidad mínima de conejos estimada, 1 conejo/ha en otoño, puede servir como densidad umbral por encima de la cual una población de lince puede mantener su organización espacial y su estabilidad numérica (Palomares *et al.* 2001).

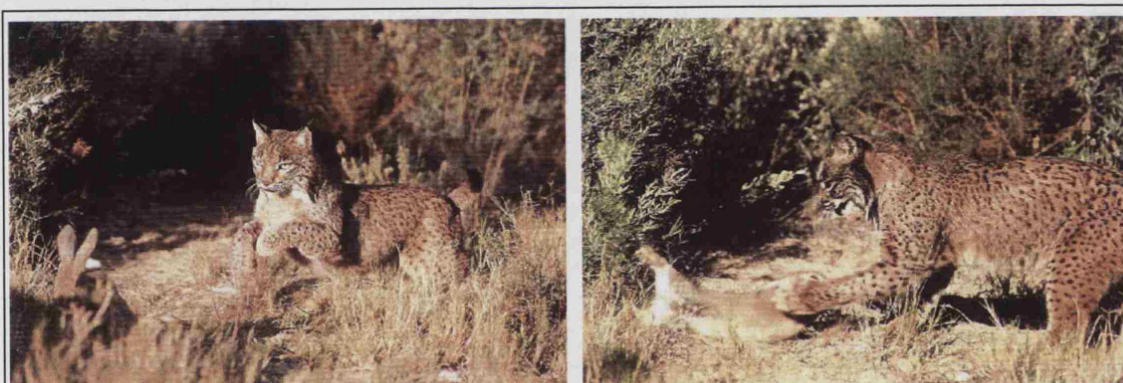


Fig. 3. Lince Ibérico cazando un conejo (©Antonio Sabater. 2001).

El antecesor más reciente del lince ibérico (*Lynx pardinus spaeleus*) ocupaba la península Ibérica y se extendía al norte de los Pirineos hasta el sur de Alemania, aunque los límites precisos no se conocen bien (Kurtén y Grandqvist 1987, Rodríguez y Delibes 2002). La distribución histórica máxima del lince ibérico (Rodríguez y Delibes 2002) incluía el norte de los Pirineos pero que posteriormente se redujo a la Península Ibérica debido a la presión ejercida en Europa central por el lince boreal procedente de Asia (Kurtén y Grandqvist 1987). No obstante, parece que ambas especies han coexistido sin hibridarse en el norte de España y sur de Francia (Altuna 1980).

Los restos arqueológicos del lince ibérico se distribuyen ampliamente por toda la península. Posteriormente se dispone de información en el siglo XIX, momento en el que los naturalistas reflejan en sus publicaciones la ausencia de la especie en la mitad norte peninsular y en la costa mediterránea hasta Almería. En 1950 la especie redujo su área de distribución a la mitad suroeste de España y sur de Portugal (Rodríguez y Delibes 1990) con existencia de algunas poblaciones relictas en el norte y este de la península (Valverde 1963, Garzón 1978, Delibes 1979). La causa del retroceso hasta este momento fue la caza. En 1960 la especie ya se describía como rara y sólo estaba presente en zonas del centro y sur de la península (Valverde 1963) (Fig. 4). La segunda etapa de regresión abarca hasta la década de los 70, coincidiendo con un rápido desarrollo económico en España. En este

momento las principales amenazas para la especie fueron la destrucción de hábitats, la fragmentación de sus poblaciones como consecuencia de la creación de grandes infraestructuras como embalses, carreteras y ferrocarriles, y la acusada disminución de las poblaciones de conejo, que llegó a desaparecer de algunas zonas como consecuencia de las epidemias de mixomatosis en los años 50 - 60 y enfermedad hemorrágica vírica en 1988, momento en el que el lince ibérico había perdido más del 81% de su rango geográfico original (Rodríguez y Delibes 1990) y su tamaño poblacional se estimó en 1100 ejemplares (Guzmán *et al.* 2002). La última fase de retroceso abarca desde los años 80 hasta la actualidad y en ella las principales amenazas para esta especie son el todavía limitado número de conejos en muchas zonas de distribución del lince, la antropización del medio y la fragmentación del hábitat. En 1998 las estimas poblacionales concluyeron que quedaban sólo 660 animales y los últimos censos poblacionales oficiales realizados entre 1999 y 2002 estimaban en poco más de 200 el número total de ejemplares, que se repartían en los que se consideraban los dos únicos núcleos reproductivos de la especie, aislados entre si, uno en Doñana y otro en las sierras de Andújar-Cardena (Sierra Morena oriental), con 40 - 50 y 150 animales, respectivamente.

Recientemente se han encontrado evidencia de la existencia de lince en el centro de la península Ibérica, en los Montes de Toledo (Alda *et al.* 2008), donde se le daba por "probablemente extinto" (Pertoldi *et al.* 2006) o se consideró que no se trataba de una población estable sino de un grupo de individuos aislados difíciles de detectar (Guzmán *et al.* 2002). En algunos de los enclaves (Montes de Toledo orientales y centrales y Sierra del Relumbrar-Alcaraz) donde se ha detectado la especie, los indicios se han repetido varias veces, por lo que parece tratarse de una pequeña población y no de animales dispersantes procedentes de la población de Andújar-Cardena (Alda *et al.* 2008). Quedan pendientes análisis que permitan profundizar en el origen y estatus genético de este grupo de animales.

El lince ibérico, por tanto, ha sufrido un declive muy marcado de sus poblaciones, que han alcanzado tamaños tan reducidos que amenazan su viabilidad. Ello unido a los bajos niveles de variabilidad genética (Palomares *et al.* 2002, Jonson *et al.* 2004, Pertoldi *et al.* 2006) hacen a estas poblaciones muy vulnerables frente a riesgos ambientales o aparición de nuevos patógenos.

Esta situación de declive continuo desde comienzos del siglo XX, ha generado gran preocupación y se han diseñado estrategias para frenar dicho descenso. El trabajo realizado *in situ* parece estar fructificando y en el periodo entre 2004 y 2008 se ha registrado el nacimiento de 228 ejemplares en libertad, 164 en Sierra Morena y 64 en Doñana (Junta de Andalucía 2008a).

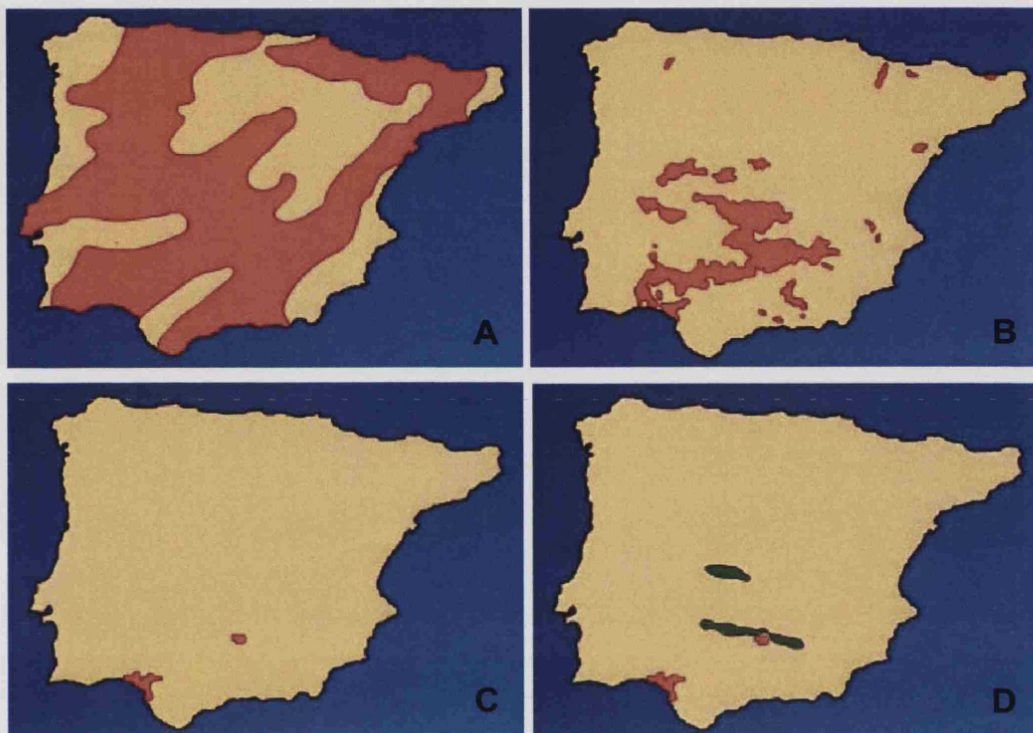


Fig. 4. Área de distribución del Lince Ibérico en (A) 1900, (B) 1960, and (C) 2002 y (D) 2008. En verde las zonas donde recientemente se ha verificado la existencia de lince ibérico (Alda *et al.* 2008) (Modificado de www.ellinceiberico.com).

De acuerdo con la situación descrita, el lince ibérico está protegido legalmente a varias escalas. Es la única especie de felino que se encuentra dentro de la categoría "Críticamente Amenazado" (C2a(i)) en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2008) y el Grupo de Especialista en Felinos de la IUCN (CSG/IUCN) lo cataloga como la especie de felino más amenazada del mundo. La Directiva Europea para la Conservación de la Flora y Fauna salvajes (92/43/EEC transpuesta por el RD 1997/1995) lista la especie en el Anexo II "especie prioritaria que requiere medidas especiales de protección del hábitat" y en el Anexo IV "estrictamente protegido". La Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES; Washington 1973) sitúa la especie en el Apéndice I: especies en peligro de extinción que pueden verse muy afectadas por el comercio. El Convenio relativo a la conservación de la vida salvaje y del medio natural en Europa (Berna 1979) coloca al lince ibérico en el Apéndice II: estrictamente protegido. En España, el lince ibérico está incluido en el Anexo I "amenazado en peligro de extinción" en el RD 439/1990 relativo al Catálogo Nacional de Especies Amenazadas de España. En Portugal está igualmente catalogado como en peligro de extinción, en el Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral 2005).

Los Programas de Cría en Cautividad

Nadie pone en duda que la preservación del medio natural es una prioridad de cara a conservar la biodiversidad. Pero el reducido tamaño alcanzado por algunas poblaciones hace improbable que sobrevivan exclusivamente con la conservación o restauración del espacio al que han quedado relegadas ya que, aunque esto fuese posible, es muy probable que el uso de territorios adyacentes para otros fines no permita la conexión con otras poblaciones aisladas, por lo no se produciría flujo genético. Además puede darse el caso de que la disminución del tamaño poblacional hasta el límite de viabilidad (MVP) pueda deberse a causas distintas de la destrucción de medio como la excesiva presión cinegética o la caza furtiva sobre la especie o sus presas (como es el caso del perrito de las praderas - turón de patas negras), o motivos sanitarios sobre la propia especie o sus presas, tal como ha pasado en el caso del conejo del monte y el lince ibérico. Por estos motivos se hace necesario reconocer la existencia de estrategias complementarias de conservación de la biodiversidad, entre ellas la cría en cautividad, los bancos de recursos biológicos y el uso de biotecnologías reproductivas o técnicas de reproducción asistida (ARTs) (Roldán y Garde 2004).

Los programas de cría en cautividad se convierten en algunos casos en una herramienta de gran utilidad para la conservación de una especie. Como regla general, se recomienda comenzar un programa de cría para la conservación cuando las poblaciones silvestres de una especie están sufriendo un declive vertiginoso y no se conocen, o no se pueden controlar de modo efectivo, los factores que están causando dicho declive. El problema es que con frecuencia se ponen en marcha cuando la especie está al borde de la extinción y la población fundadora cuenta con muy pocos individuos por lo que se parte de un problema de reducida variabilidad genética con consecuencias negativas sobre la reproducción y viabilidad de los individuos (Ralls y Ballou 1986), lo que podría limitar el éxito de futuras reintroducciones. Los programas de cría en cautividad constituyen además un recurso para la obtención de información biológica muy difícil o imposible de conseguir a partir de animales de vida libre y permiten la reintroducción de animales, en poblaciones aún existentes pero debilitadas o en zonas históricamente ocupadas de las que la especie ha desaparecido. Finalmente, sirven también como herramienta educativa, para incrementar la conciencia social sobre la problemática de conservación de algunas especies.

La mayoría de las especies de felinos se han criado en cautividad, pero con éxito variable entre ellas (Nowell y Jackson 1996). Las variables que influyen sobre el éxito reproductivo en cautividad incluyen características de las instalaciones, grado de interacción con conespecíficos de distinto sexo y con los cuidadores, problemas de salud y situaciones de estrés (Dobson *et al.* 2000, Dobson y Smith 2001).

En España, el programa de cría en cautividad, que forma parte del programa de conservación *ex-situ* del lince ibérico, se aprobó en 2001 (siguiendo la directrices de la Estrategia para la Conservación del lince Ibérico de 1999) y empezó a funcionar en 2003 (Pérez de Albéniz 2006, Vargas *et al.* 2008, www.lynxexsitu.es). Los primeros nacimientos en cautividad ocurrieron en 2005, en el centro de cría de lince ibérico de "El Acebuche". A esta primera camada, constituida por tres cachorros, dos hembras y un macho, han seguido otras muchas en los años posteriores, hasta alcanzarse los 24 ejemplares nacidos en cautividad en el año 2008 (Programa Conservación Ex-Situ del Lince Ibérico 2008) (Fig. 5).

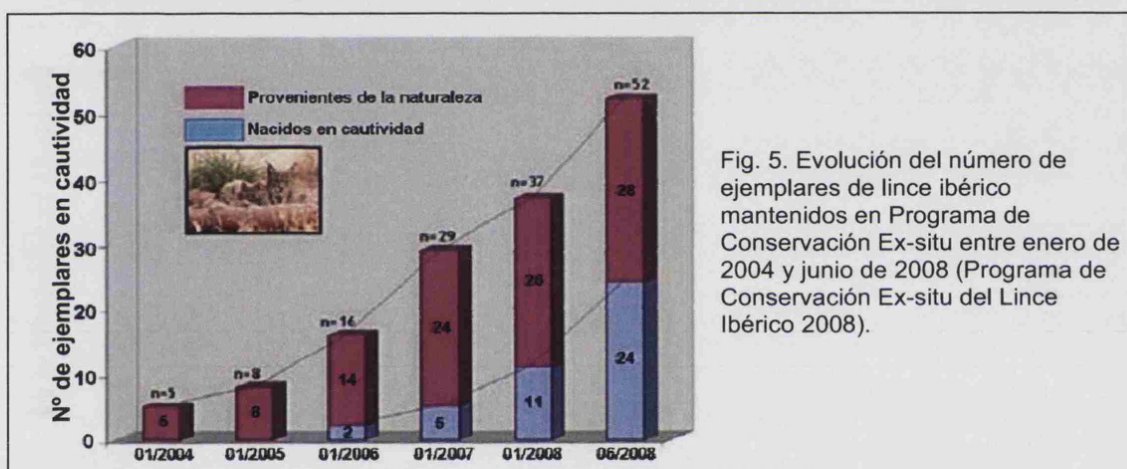


Fig. 5. Evolución del número de ejemplares de lince ibérico mantenidos en Programa de Conservación Ex-situ entre enero de 2004 y junio de 2008 (Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico 2008).

Los objetivos iniciales del Programa de Conservación *Ex-Situ* del Lince Ibérico planteaban las primeras reintroducciones para el año 2010 (Vargas *et al.* 2007), pero los buenos resultados de la cría en cautividad obtenidos y el éxito de la traslocación experimental de un macho de la población de Sierra Morena a la de Doñana en diciembre de 2007 (Junta de Andalucía 2008a, b) ha hecho considerar la posibilidad de adelantar la reintroducción a 2009 (Junta de Andalucía 2008c).

La puesta en marcha de un programa de cría en cautividad no necesariamente involucra el desarrollo de ARTs pero, dada la utilidad de estas biotecnologías como medio para solucionar problemas de incompatibilidad comportamental entre individuos e infertilidad o para facilitar el flujo génico entre poblaciones (tanto en cautividad como en libertad) y conservar la mayor cantidad de recursos genéticos en un momento dado, se aconseja vincular ambas herramientas (Roldan y Garde 2004).

Por otra parte, puede recurrirse a estas biotecnologías sin un programa de cría en cautividad ya que éstas ofrecen nuevas vías para la introducción de material genético en poblaciones de vida libre (Fig. 6), sin necesidad de traslocar animales, evitando por tanto los riesgos asociados a estos movimientos como estrés, inadaptación social y/o transmisión de

parásitos y enfermedades, que impidan la reproducción y supervivencia de los individuos introducidos (Roldan y Garde 2004).

En realidad, para alcanzar un éxito razonable en los programas de conservación es aconsejable integrar las biotecnologías reproductivas con las estrategias tradicionales de “propagación” y considerar a las poblaciones cautivas y en libertad como un único recurso (Swanson *et al.* 2007). Lo ideal es que las ARTs sirvan de nexo de unión entre poblaciones *in-situ* y *ex-situ*. El flujo de material genético se puede producir hacia la naturaleza a partir de animales cautivos o al revés, de forma que se eviten los problemas de consanguinidad frecuentes en las poblaciones cautivas sin necesidad de extraer ningún individuo del medio natural (Swanson *et al.* 2007). Para poder llevar a cabo estas transferencias de material genético es necesaria la puesta a punto de protocolos de captura y anestesia seguros, acompañados de métodos de recogida, procesado y criopreservación de gametos adecuados a la especie y a las condiciones de campo (Swanson *et al.* 2007).

Los Bancos de Recursos Biológicos y las Técnicas de Reproducción Asistida (ARTs)

En los Bancos de Recursos Biológicos se conservan criopreservados espermatozoides, óvulos y embriones, células somáticas, tejidos, tumores, fluidos (sangre, suero, plasma, orina), heces y pelos. Se denominan Bancos de Germoplasma cuando incluyen sólo gametos y embriones y Bancos de Recursos Genéticos (GRB) cuando junto a los gametos y embriones se conservan células somáticas y tejidos. Estos bancos no son meros almacenes de biomateriales sino que se trata de reservas de material vivo, que permiten conservar indefinidamente la variabilidad genética existente en el momento de la recogida, por lo que representan un seguro de vida para las especies de las que se conservan las muestras (Wildt *et al.* 1997, Holt y Pickard 1999). Igual que ocurre con las biotecnologías reproductivas, la forma de conseguir los mejores resultados por medio de estos bancos es obteniendo muestras tanto de animales cautivos como en libertad, e incluso animales muertos (recuperación de espermatozoides de epidídimo, oocitos de los ovarios, fibroblastos de la epidermis) haciendo posible su reproducción futura y su contribución al pool genético de la especie con unos genes que de otra forma se perderían. La transferencia de recursos de estos bancos a las poblaciones cautivas o salvajes de una determinada especie precisa del conocimiento detallado de su fisiología reproductiva para poder aplicar biotecnologías reproductivas con éxito. La conservación de tejidos, sangre, etc., asociados a los gametos puede además permitir genotipar o llevar a cabo estudios epidemiológicos de las muestras.

En España existe un banco de recursos genéticos de 3 especies de gacelas norteafricanas amenazadas, gacela dorcas (*Gazella dorcas neglecta*), gacela dama (*Gazella dama mohr*) y gacela de Cuvier (*Gazella cuvieri*) (Garde *et al.* 2003, 2006a, Roldan *et al.*

2006b, González *et al.* 2008, Berlinguer *et al.* 2008) vinculado a los programas de cría en cautividad de estas especies iniciados en 1971 en la Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA-CSIC). Existe también un banco de semen de ciervo ibérico (*Cervus elaphus*) creado por el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCLM) en 1991 en el campus de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) (Garde *et al.* 2006b). Finalmente, se encuentra el Banco de Germoplasma y Tejidos de especies silvestres (BanGES), en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), en el marco del cual se ha desarrollado esta tesis, fruto de un convenio entre el CSIC y el Ministerio de Medio Ambiente firmado en octubre de 2003 y que presta especial atención a mamíferos amenazados ibéricos (Roldán *et al.* 2005), con especial interés en el lince ibérico (Roldán *et al.* 2006a, Crespo *et al.* 2007) y en el visón europeo (del Olmo *et al.* 2005).



Fig. 6. Ilustración esquemática del potencial de los bancos de recursos genéticos como nexo entre conservación *in situ* y *ex-situ*.

Las ARTs se han usado desde hace muchos años en animales domésticos y en seres humanos. Las técnicas clásicas incluyen la criopreservación de espermatozoides, la inseminación artificial (AI), la fecundación *in vitro* (IVF) y algo más recientes la congelación y transferencia de embriones (ET) procedentes de desarrollo *in vitro* o *in vivo*. Otras técnicas de nueva aplicación y que se encuentran en distintas fases de desarrollo en animales salvajes son la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la congelación de

oocitos y la preselección de sexo mediante separación de espermatozoides X e Y, así como la clonación mediante transferencia de núcleo (NT) (Roldán y Gomendio 2009).

Para el desarrollo de estas biotecnologías se ha reconocido la necesidad de emplear especies modelo, que habitualmente son especies domésticas, que permiten obtener muestras suficientes y realizar las pruebas necesarias para poner a punto estas técnicas de forma que sólo sea necesario perfilar los detalles en sus "parientes" salvajes (Wildt *et al.* 1986a, Goodrowe 1992, Swanson 2003, Pukazhenthil *et al.* 2006a). El gato doméstico (*Felis catus*) ha sido muy utilizado como modelo experimental para el estudio de la biología de felinos salvajes amenazados (Wildt *et al.* 1986b, 1995, Swanson y Wildt 1995, Pope 2000), contribuyendo a su conservación, y de enfermedades humanas, incluidas anomalías anatómicas, nutricionales, inmunológicas, cardiovasculares, oncológicas y desórdenes metabólicos hereditarios así como fertilidad (Hardy 1984, Goodrowe *et al.* 1989a, Pukazhenthil *et al.* 2001, O'Brien *et al.* 2002, Menotti-Raymond *et al.* 2003). Como aproximación al lince ibérico hemos utilizado como especie modelo el gato doméstico y el lince rojo. Se ha intentado trabajar también con el lince euroasiático, por ser una especie más próxima al lince ibérico que las dos especies mencionadas y por constituir una especie de interés en sí misma, pero el éxito en la recuperación de espermatozoides fue muy bajo y las muestras obtenidas de baja calidad, de modo que los estudios con esta especie han sido limitados.

El principal objetivo de la criopreservación celular es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de las células. La supervivencia celular a la congelación-descongelación es producto de numerosos factores que interaccionan entre sí. La criopreservación tiene lugar habitualmente en una solución acuosa con diferentes solutos añadidos y los cambios físico-químicos que tienen lugar durante la congelación derivan en gran medida de la concentración de estos aditivos en dicha solución.

El espermatozoide fue el primer tipo de célula en congelarse. La historia de la criobiología espermática se remonta a hace 230 años cuando se observó motilidad en espermatozoides de humano y de caballo conservados en la nieve (Spallanzani 1776). A finales del siglo XIX se observó motilidad en espermatozoides humanos conservados a -17°C y surgieron las primeras especulaciones sobre el potencial fecundante de estas células (Mantegazza 1866). A mediados del siglo XX fueron observados espermatozoides humanos móviles conservados a -269°C (Jahnel 1938). Poco después se recuperaron espermatozoides humanos móviles después de 70 días a -79°C (Shettles 1940). En los años 50 se descubrió que los espermatozoides podían congelarse y descongelarse conservando motilidad si el glicerol formaba parte del medio en el que estaban suspendidos (Polge *et al.* 1949), y se obtuvo el primer nacimiento a partir de semen congelado, el ternero "Frosty" (Stewart 1951). En la actualidad se criopreservan con éxito los espermatozoides de más de

50 especies de mamíferos, pero aún queda mucho por investigar. El principal problema de la criopreservación de espermatozoides sigue siendo el descenso de la motilidad, de la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto y de la funcionalidad de los espermatozoides supervivientes que tiene lugar como consecuencia de la congelación-descongelación.

La respuesta de las células a la criopreservación está esencialmente marcada por la relación área/volumen, que en espermatozoides es muy alta debido a la longitud del flagelo, y el contenido en agua, que es de alrededor del 80% del volumen total de una célula somática y alrededor del 50% en el espermatozoide porque el citoplasma es muy limitado.

Génesis de los espermatozoides

Los espermatozoides son células altamente especializadas y diferenciadas en las que están ausentes algunos organelos como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y los ribosomas pero presentan otros organelos especializados, con funciones específicas en el proceso de fecundación y de desarrollo temprano, como el acrosoma y el centriolo proximal. El acrosoma es un gránulo que se forma a partir del aparato de Golgi y que a modo de "caperuza" se encuentra en la parte anterior del núcleo, por debajo de la membrana plasmática, y contiene enzimas proteolíticas que digieren las cubiertas externas del oocito tras la reacción acrosómica como parte del proceso de fecundación. Su forma y tamaño varían entre especies. El acrosoma de los felinos salvajes, como el del gato doméstico es compacto, densamente asentado sobre la cabeza del espermatozoide, lo que le hace difícil de diferenciar con óptica de campo claro o contraste de fase (Schmehl y Graham 1989, Goodrowe 1992) sin tinción previa. El centriolo proximal se ubica en el cuello del espermatozoide y participa en la unión del material genético paterno y el materno (singamia) (Fig. 7).

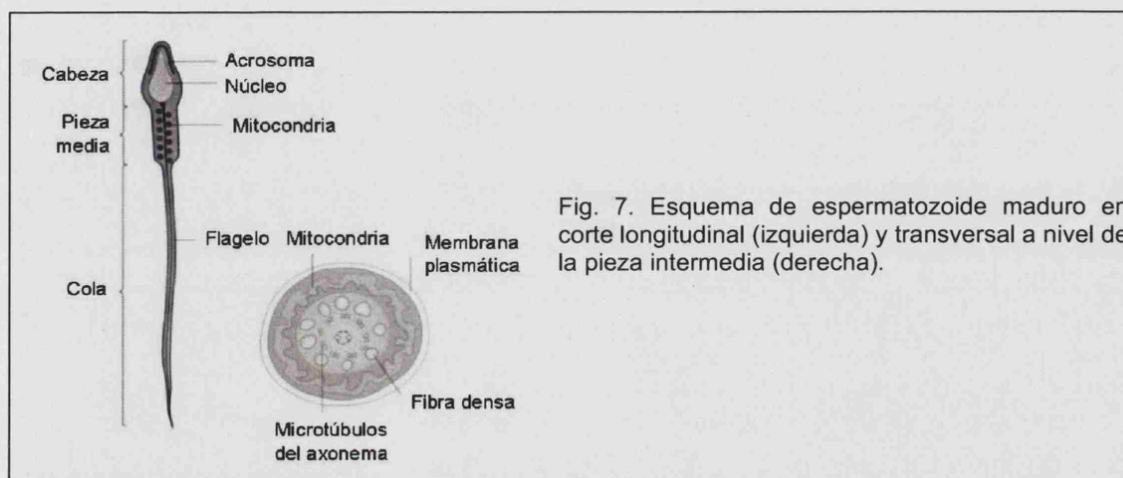


Fig. 7. Esquema de espermatozoide maduro en corte longitudinal (izquierda) y transversal a nivel de la pieza intermedia (derecha).

El proceso que convierte a las células germinales diploides en espermatozoides haploides mediante la meiosis es la espermatogénesis que tiene lugar en los túbulos seminíferos (Robaire 1999). Los túbulos drenan a partir de la red testicular al epidídimo, un conducto sinuoso donde los espermatozoides maduran, adquieren la capacidad de moverse y son conducidos hasta los conductos deferentes que terminan en el conducto eyaculatorio, cerca de la próstata (Amann y Hammersted 1993a, Tsutsui *et al.* 2004, Axné 2006) (Fig. 8). En muchos mamíferos, a cada lado de la próstata se localizan las vesículas seminales, pero éstas no están presentes en felinos. Las secreciones de las glándulas accesorias se vacían al conducto eyaculatorio formando, junto a los espermatozoides, el semen.

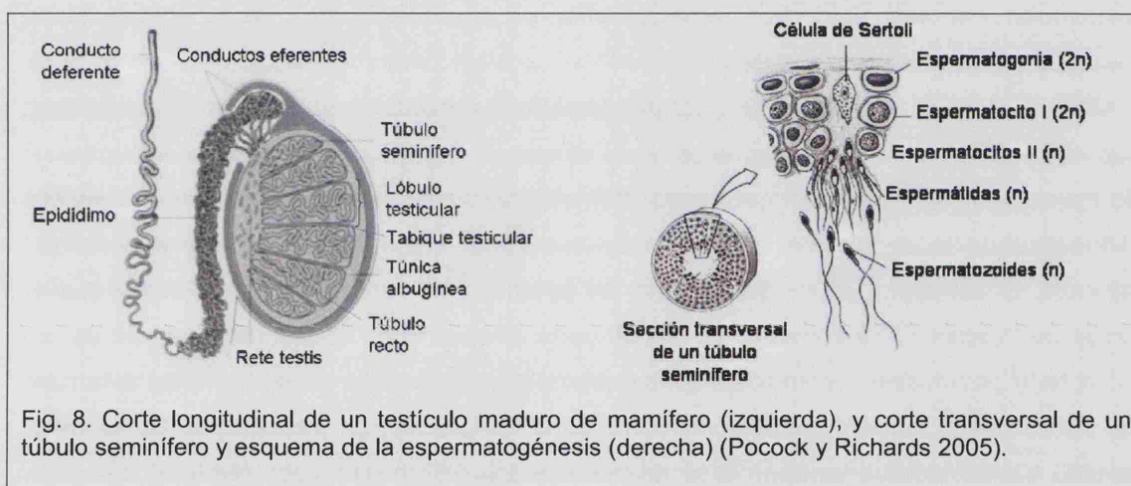


Fig. 8. Corte longitudinal de un testículo maduro de mamífero (izquierda), y corte transversal de un túbulo seminífero y esquema de la espermatogénesis (derecha) (Pocock y Richards 2005).

Una vez eyaculados, los espermatozoides maduros y móviles aún deben experimentar una serie de cambios que les doten de la capacidad de interaccionar con el óvulo. Estos cambios tienen lugar en el tracto reproductivo femenino y se conocen como capacitación espermática (Wildt 1991, Yanagimachi 1994), que es un proceso dependiente del calcio y que involucra alteraciones de la membrana plasmática que sensibilizan al espermatozoide frente a las señales del óvulo (Fraser 1990, Yanagimachi 1994). La capacitación está relacionada con otros dos eventos fundamentales que son, primero, la hiperactivación de la motilidad, caracterizada por el aumento de la velocidad y amplitud de la trayectoria y la asimetría en las ondas del flagelo y segundo, la reacción acrosómica, que consiste en múltiples fusiones de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa, que provocan la liberación de las enzimas contenidas en el acrosoma y preparan al espermatozoide para la fusión con el oocito.

Obtención y criopreservación de espermatozoides

La obtención de espermatozoides maduros puede hacerse *in vivo*, mediante recogida post-cópula, manipulación digital, vagina artificial, masaje de glándulas sexuales accesorias

o electroeyaculación, y recientemente se ha explorado con éxito la obtención de semen mediante cateterización uretral (Zambelli *et al.* 2008). También puede realizarse *post mortem*, mediante lavado del conducto deferente o por recogida directa, punción o maceración de la cola del epidídimo en un medio de cultivo o diluyente crioprotector (Howard 1986, Zambelli y Cunto 2006). Estas técnicas resultan muy útiles porque permiten recuperar espermatozoides de animales castrados y también de machos que hayan muerto recientemente ya sea por caza o por accidente (caso de carnívoros como el lince ibérico que mueren atropellados). El empleo de vagina artificial y la electroeyaculación son los métodos más utilizados en felinos *in vivo* (Luvoni 2006, Zambelli y Cunto 2006) y no se han encontrado diferencias significativas entre las muestras extraídas por ambos métodos (Luvoni 2006). En cuanto a los espermatozoides eyaculados o epididimarios, no se han encontrado diferencias significativas en motilidad, integridad de membrana plasmática o acrosómica o morfología entre ambos tipos (Tebet *et al.* 2006, Luvoni 2006). Se observa un ligero incremento en el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en aquéllos procedentes del epidídimo frente a los eyaculados y esta gota puede provocar que se doblen la pieza media o terminal del flagelo, pero suele desaparecer durante la centrifugación del semen como parte del proceso de criopreservación (Tebet *et al.* 2006). Tanto en espermatozoides eyaculados como epididimarios se produce una merma en motilidad y proporción de acrosomas intactos debida al proceso de congelación-descongelación. Parece que los espermatozoides epididimarios presentan justo después de la extracción menor proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto y que el daño de los acrosomas debido a la congelación-descongelación es más acentuado que en espermatozoides eyaculados, pero no se ha realizado una prueba de criotolerancia acrosómica diferencial que demuestre inequívocamente esta diferencia (Luvoni 2006).

Los espermatozoides de las distintas especies de mamíferos muestran un grado variable de respuestas adversas (choque térmico) ante una reducción de la temperatura, que es una forma de estrés térmico (Wildt *et al.* 1995, Holt 2000b). Estas diferencias en criosensibilidad vienen dadas por la existencia de diferencias en la composición de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática de los espermatozoides, que se traducen en diferencias en la capacidad de sobrevivir al proceso de congelación-descongelación (Fuchs *et al.* 2008). Los espermatozoides de los ungulados parecen especialmente sensibles al choque térmico pero existen diferencias en el grado de sensibilidad entre especies y por ello la mayoría de los autores recomiendan la bajada lenta desde temperatura ambiente hasta los 4°C (Watson 1979, 1990). Aún no está claro por qué las tasas de refrigeración más rápidas resultan más dañinas para los espermatozoides de muchas especies, pero la mayoría de los estudios lo relacionan con cambios de fase en los lípidos de membrana que les hacen perder integridad (Watson 1981). El rango de temperaturas más dañino,

invariablemente, es aquel en el que se producen profundos cambios de fase, entre 20 y 0°C. Los procesos físicos, químicos y biológicos del congelamiento celular ocurren entre -15 y -60°C (Mazur 1984). Las especies en las que el choque térmico es más agudo son aquellas en las que se produce un cambio de fase más pronunciado, como en el cerdo (Drobnis *et al.* 1993).

Se ha demostrado que hay diferencias entre individuos de una misma especie en cuanto a la respuesta de sus espermatozoides a la criopreservación (Leibo y Bradley 1999, Holt 2000a). La influencia del factor individual sobre la congelabilidad espermática parece estar ampliamente extendido, aunque es más marcado en unas especies que en otras. En los mamíferos se ha descrito en gato doméstico (Tsutsui *et al.* 2003), perro (Yu *et al.* 2002, Eilts 2005), mono rhesus (Leibo *et al.* 2007), humano (Cohen *et al.* 1981, McLaughlin *et al.* 1992, Henry *et al.* 1993), cérvidos (Soler *et al.* 2003, Estes *et al.* 2006) y ganado vacuno (Parkinson y Whitfield 1987), y es también muy evidente entre caballos (Pickett y Amann 1993) y cerdos (Thurston *et al.* 1999, Waterhouse *et al.* 2006).

Los procesos de congelación-descongelación, además de provocar la muerte de muchos espermatozoides, pueden provocar alteraciones fisiológicas en aquéllos que sobreviven. De modo que, un aspecto fundamental para evaluar el proceso de congelación-descongelación es el análisis de la proporción de células que se mantienen funcionales a la descongelación. La funcionalidad de un espermatozoide abarca su capacidad de experimentar varios procesos (Howard 1993): capacitación, reacción acrosómica, penetración de la zona pelúcida del oocito, fusión con la membrana plasmática del oocito y otros procesos dentro del mismo hasta la aproximación de los dos pronúcleos en el cigoto (singamia).

Factores externos que condicionan la supervivencia de los espermatozoides a la congelación

El cambio de temperatura

La velocidad o tasa de enfriamiento-calentamiento (°C/min) desde temperatura ambiente (20°C) a 0°C y a -79°C (hielo seco) ó -196°C (nitrógeno líquido), y de nuevo hasta temperatura ambiente, es uno de los factores más importantes que condicionan la viabilidad celular (Mazur 1985). Las membranas celulares son las estructuras que experimentan mayor daño en los procesos de congelación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de los lípidos de fluidos a sólidos ocurre entre 10 y 16°C y hace que se alteren todas las funciones de la membrana y que ésta se vuelva muy frágil (Grossmann y Santaló 1991, Parks 1997). Pero, si bien una adecuada velocidad de enfriamiento y descongelación son necesarias para evitar la congelación intracelular, no garantizan por sí solas la supervivencia celular ya que entran en juego otros factores.

La formación de cristales de hielo y el efecto disolución

Los efectos de la temperatura pueden separarse de los efectos de los cristales de hielo si se consideran las respuestas que tienen lugar en un rango de temperatura por encima del cual el agua se congela. Cuando una suspensión celular se enfría y alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo que se distribuyen aleatoriamente por el espacio extracelular generando regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento de cristales dentro de la célula (Vila y García 1983). A medida que ocurre la cristalización en el medio extracelular los solutos van quedando cada vez más concentrados en la fracción líquida lo cual provoca que las células en suspensión deban deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio cada vez más hiperosmótico y en consecuencia se contraen (Mazur 1984).

Una congelación lenta, y por tanto, una exposición prolongada a condiciones hiperosmóticas llevan a las células a una deshidratación extrema que puede llegar al colapso celular. Si por el contrario la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida las células pueden no ser capaces de deshidratarse suficientemente rápido y, al llegar a la temperatura de nucleación de cristales, el agua remanente se congela formando hielo intracelular con el consiguiente daño o disrupción citoplasmática. Existe por tanto un compromiso entre tasas de congelación más lentas o más rápidas que obliga a examinar los efectos de la una y la otra para tratar de minimizar los daños generados por la congelación.

La descongelación supone el proceso contrario, de disolución de los cristales extracelulares, con la consecuente entrada de agua dentro de las células, que puede causar la disrupción de la membrana celular. La tasa de descongelación debe ser acorde con la de refrigeración-congelación empleada. Lo más frecuente es exponer las muestras congeladas al aire y sumergirlas en un baño de agua a 5, 25, 37 ó 70 °C, dependiendo del contenedor y de la velocidad de descongelación deseada, y sólo ocasionalmente se emplean máquinas programables que permiten una descongelación controlada.

La composición del diluyente. El efecto de aditivos y crioprotectores

Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico (máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos solidifiquen conjuntamente) lo que implica que se alcanzará una concentración de solutos dada a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor. En presencia de crioprotector la permeabilidad de la membrana al agua es mucho menor (Gilmore *et al.* 1997). En función de esta permeabilidad a través de la membrana celular los crioprotectores pueden clasificarse como:

1. Penetrantes: son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que el agua. Los más utilizados son el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilén-glicol (EG), 1,2-propanodiol (PROH), butanodiol, acetamida y metanol.

2. No penetrantes: no son crioprotectores propiamente dichos sino que se trata de agentes osmóticos ya que, por ser sustancias de alto peso molecular, no penetran en la célula y resultan efectivas cuando la congelación ocurre a velocidad alta ya que promueven la rápida deshidratación celular. Suelen usarse asociados a agentes penetrantes y junto a cloruro de sodio y otros iones con el objetivo de aportar suficiente carga iónica. Los más utilizados son azúcares como rafinosa, lactosa, fructosa, sacarosa, glucosa o dextrosa, polímeros como la polivinil-pirrolidona (PVP) y otros compuestos como polietilen-glicol (PEG) o dextrano y compuestos como glicina, glutamina y prolina.

Junto a los crioprotectores suele añadirse como agentes protectores adicionales yema de huevo o leche porque se considera que también protegen las células contra el choque térmico y tiene un efecto de transición con la fase lipídica (Bergeron y Manjunath 2006, Manjunath *et al.* 2007). El añadido de estas sustancias de origen animal es discutido además debido a su alta susceptibilidad a las infecciones bacterianas y en consecuencia al riesgo sanitario que conlleva su utilización. En algunas especies (bovinos) se han probado diluyentes a base de lecitina de soja en lugar de aditivos de origen animal y se han obtenido resultados tan buenos como con diluyentes que contienen yema de huevo (Aires *et al.* 2003).

Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse de una sola vez o por pasos. Se recomienda lo segundo, particularmente durante la eliminación de los crioprotectores (Gao *et al.* 1993) para reducir el estrés osmótico que soportarán las células, que puede causarles desde fuertes daños hasta la muerte debido a la contracción o hinchamiento excesivos (Mazur y Schneider 1986, Gao *et al.* 1995).

El crioprotector más ampliamente utilizado para criopreservación de espermatozoides es el glicerol. El descubrimiento de su acción en los años 50 revolucionó el mundo de la criobiología. Resulta tóxico para los espermatozoides de muchas especies, pero, a la vez es el más adecuado para espermatozoides (Watson 1990), es decir, que sus efectos tóxicos se compensan con su efecto beneficioso. Habitualmente se trabaja con concentraciones de entre 4 y 10 % (v/v) aunque hay especies como el cerdo especialmente sensibles a su toxicidad que precisan concentraciones del 2% o menores. El glicerol diluido en la fase acuosa del diluyente tiene acción coligativa que consiste en reducir la cantidad de hielo a cualquier temperatura por debajo del punto de congelación, y que tiene como resultado una menor concentración de sales a determinadas temperaturas por debajo del

punto de congelación. Sin embargo, es un crioprotector que penetra la membrana de las células por lo que tiene una serie de efectos en las células vivas (Hammerstedt y Graham 1992). En función de la permeabilidad de las membranas puede ejercer efectos osmóticos transitorios que generen fluctuaciones de volumen celular incompatibles con la supervivencia (Gao *et al.* 1995). Se ha observado además que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken *et al.* 1983).

Factores internos que condicionan el estado funcional de los espermatozoides supervivientes

Daño oxidativo

Los espermatozoides de los mamíferos se caracterizan por su capacidad de generar sustancias o especies óxido reactivas (ROS) como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) esenciales en los acontecimientos que preceden a la fecundación bajo el control de determinados antioxidantes (de Lamirande y Gagnon 1995). Normalmente la producción de ROS ocurre en las mitocondrias, durante el consumo de oxígeno, cuando el agua se reduce secuencialmente. En situaciones normales, el semen presenta, en los espermatozoides y en el plasma seminal, sustancias con capacidad antioxidante (enzimas superóxido dismutasa o SOD) como las vitaminas C y D, la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx) que participan en las transformaciones de las especies reactivas del oxígeno, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido y previenen el daño oxidativo. El metabolismo normal del oxígeno produce ROS que pueden alterar la función espermática. La criopreservación induce la formación de ROS adicionales, por la presencia de sustancias prooxidantes en los diluyentes (Bilodeau *et al.* 2002) que son perjudiciales para el posterior rendimiento de los espermatozoides. Como durante la criopreservación de semen el descenso de la temperatura produce una disminución de la actividad y de la concentración de las enzimas antioxidantes (Álvarez y Storey 1992) se produce el desequilibrio entre la generación de ROS y los mecanismos de defensa antioxidantes que dan lugar a una situación de estrés oxidativo (Zalata *et al.* 1995). Este estrés funcional terminará a corto plazo con la muerte de los espermatozoides que lo experimentan y, además, potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica, oxidación de las proteínas y daños en el ADN en los espermatozoides que sobrevivan, lo cual da lugar al "envejecimiento prematuro", que provocará la muerte espermática en corto período de tiempo (Aitken y Fisher 1994, Saleh y Agarwal 2002, Brouwers *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que la adición de antioxidantes a los diluyentes durante el proceso de criopreservación reduce el daño oxidativo (Watson y Anderson 1983, Sánchez-Partida *et al.* 1997, Aisen *et al.* 2000, Santiani 2003). Para el caso de los felinos, recientemente se ha

encontrado un efecto beneficioso de la adición de cisteína y vitamina E hidrosoluble sobre la proporción de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva y la integridad de la membrana espermática y el ADN en espermatozoides epididimarios de gato doméstico (Thuwanut *et al.* 2008).

La estabilidad de membrana

El funcionamiento adecuado de la membrana celular depende de su capacidad de permitir el transporte de determinados fluidos y ciertas moléculas a través de ella. Como consecuencia de los cambios de temperatura durante la congelación-descongelación, las membranas se ven expuestas a los factores físicos mencionados anteriormente, que son la fuerza física del frente de hielo extracelular, que presiona sobre las células deformándolas y puede resultar letal a bajas temperaturas, y el estrés osmótico (Mazur 1984). Un elemento crítico del proceso de enfriamiento es el paso de agua a través de la membrana, cuya velocidad depende de la permeabilidad de dicha membrana, la proporción superficie/volumen de la célula, la temperatura y la diferencia de osmolaridad dentro y fuera de la célula (Luvoni 2006). Además la membrana plasmática de los espermatozoides tiene un alto contenido en fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados que la tornan vulnerable al ataque de ROS. La formación de ROS adicionales debida a la criopreservación puede provocar pérdida de fluidez en la membrana por la peroxidación de los ácidos grasos no saturados que la componen, alterando profundamente el comportamiento espermático y conduciendo a problemas de migración, capacitación, unión y fusión de gametos así como una acumulación de calcio en el interior de la célula típica de espermatozoides capacitados (Watson 2000).

Integridad de los receptores de membrana

La observación mediante técnicas de criofractura de la membrana plasmática del espermatozoide pone en evidencia que el agrupamiento de proteínas de membrana durante la separación de la fase lipídica inducida por la criopreservación no es completamente reversible y pueden tener implicaciones en las interacciones espermatozoide-oocito (receptor-ligando) (Watson 2000).

Estructura nuclear

El núcleo espermático presenta una organización muy particular de la cromatina, más condensada que en las células somáticas. El estrés oxidativo, actualmente considerado como la principal causa de daño del ADN espermático, altera los procesos bioquímicos que se llevan a cabo durante la espermatogénesis y puede provocar fallos en la reproducción y en el desarrollo embrionario posterior (Salamon y Maxwell 1995, Silva y Gadella 2006, Lin *et*

al. 2008). Los espermatozoides con el ADN dañado suelen presentar problemas de motilidad y anormalidades morfológicas y, pese a que han mostrado características de adherencia a la zona pelúcida normales (Silva y Gadella 2006), pueden dar lugar a tasas de fecundación bajas y apoptosis de los embriones (Aitken y Krausz 2001, Singh *et al.* 2003, Aitken *et al.* 2004, Lewis y Aitken 2005, Fatehi *et al.* 2006, Lin *et al.* 2008). Además puede haber consecuencias en la descendencia cuando la gestación llega a término (Aitken *et al.* 2004, Lewis y Aitken 2005).

Consideraciones adicionales sobre la criopreservación espermática

Sistema de almacenamiento de una suspensión espermática congelada

Originalmente los espermatozoides se almacenaban en ampollas (~1ml) que fueron sustituidas por píldoras (30-150 μ l) o pajuelas de plástico (0,25-0,5 ml, o de hasta 5 ml). Las pajuelas son mejores para una congelación rápida debido a la alta relación superficie/volumen que presentan y además por que pueden ser identificadas clara y permanentemente sobre la superficie. Las píldoras se congelan en huecos sobre la superficie de un bloque de hielo seco (CO_2 sólido a -79°C) por lo que requieren de poco equipo, pero su manejo es más complicado debido a la dificultad de identificarlas individualmente y a su mayor riesgo de contaminación (al carecer de recipiente) pudiendo por ello actuar como vector en la propagación de enfermedades. Este factor es importante porque influye en el perfil de descongelación ya que el tamaño y composición del recipiente en el que se encuentran los espermatozoides determinan la conductividad térmica.

Utilización de nitrógeno líquido y transmisión de enfermedades

Hay dos cuestiones que se han de tener en cuenta relativas al nitrógeno líquido. En primer lugar, dado que las muestras se almacenan en diluyente de congelación en estado líquido hay posibilidad de que el nitrógeno líquido penetre en la suspensión celular y que a la descongelación se transforme rápidamente en gas pudiendo romper o incluso hacer añicos el contenedor y destruyendo la muestra. Una segunda consideración sobre el nitrógeno líquido es que puede constituir una potencial vía de transporte de agentes patógenos. Esta cuestión no se ha tenido muy en cuenta para gametos animales pero está tomando cada vez más importancia en los bancos de recursos reproductivos humanos (Holt 2000b). Es fundamental que las biotecnologías reproductivas no constituyan un vector de transmisión de enfermedades. Para ello es esencial saber que el semen que se almacena y utiliza mediante ARTs está libre de patógenos específicos, dentro de unos márgenes aceptables, ya que conseguir semen estéril es imposible (Thibier y Guerin 2000). En el caso de los felinos se sabe que en el semen de gato doméstico y de guepardo hay muchas bacterias (una de las más comunes es *Escherichia coli*; Howard *et al.* 1993), que forman parte de la

microflora normal y que no interfieren en la reproducción natural pero que pueden, sin embargo, comprometer la reproducción asistida (Howard 1999). De los virus encontrados comúnmente en gatos, tales como el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), herpes virus (FHV), leucemia felina (FeLV), corona virus (FCV) y virus de la panleucopenia (FPV), sólo el virus de la inmunodeficiencia se ha investigado minuciosamente como potencial contaminante del semen (Swanson *et al.* 2007). En gatos domésticos el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) está presente en el semen y se puede transmitir horizontalmente mediante inseminación artificial intrauterina con semen fresco (Jordan *et al.* 1996, Howard 1999). En algunas especies no domésticas como el gato de Pallas no se ha detectado ADN del herpesvirus felino ni en el plasma seminal ni en los espermatozoides criopreservados del semen de gatos infectados, aunque las biopsias conjuntivales mostraron eliminación recurrente del virus (Swanson *et al.* 2006). Dada la limitada información de la que se dispone la estrategia más segura de almacenamiento de semen es la recogida de semen en machos libres de patógenos (bacterias, virus o parásitos) específicos y en caso de dudas es importante que se recoja sangre de los machos de los casos dudosos y que las muestras de semen potencialmente infectadas se haga en pajuelas selladas y protegidas con una funda exterior sellada (Holt 2000b). Se pueden implementar además medidas de bioseguridad en el procesado del semen como la centrifugación y resuspensión de los espermatozoides en medios con antibióticos, de comprobada eficacia, por ejemplo, para reducir la aparición de infecciones en las hembras inseminadas (Howard 1999).

Valoración de los espermatozoides a la descongelación

Tradicionalmente la evaluación de la calidad de una muestra de semen, fresca o criopreservada, se ha basado en la descripción de parámetros espermáticos, poniendo énfasis en el número total de espermatozoides, su motilidad y su morfología. El principio que subyace a esta aproximación es que la fertilidad de un macho puede estimarse tomando como referencia un umbral de concentración de espermatozoides móviles y morfológicamente normales que debe superarse para alcanzar la fecundación. Pero esta aproximación tiene limitaciones pues muchos estudios han demostrado que en realidad no es tanto el número total de espermatozoides lo que determina la fertilidad como su competencia funcional (Aitken 2006). Aunque se ha demostrado que la probabilidad de fecundar está relacionada con factores como el número total de espermatozoides y su morfología (Aitken 2006), se ha de tener en cuenta que existen limitaciones en esta aproximación descriptiva para detectar deficiencias funcionales causantes de infertilidad. A la vista de esta conclusión se han desarrollado varios test basados en técnicas *in vitro* que permiten evaluar aspectos de la función espermática, desde su capacidad de movimiento

hasta la fusión entre espermatozoide y óvulo para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Las cualidades espermáticas necesarias para que tenga lugar la fecundación van a depender de cómo entren en contacto espermatozoide y óvulo (de forma natural o asistida y dependiente del sistema de apareamiento o la biotecnología de que se trate, respectivamente) y de cómo esté almacenado el semen. Los requerimientos para la fecundación variarán con espermatozoides epididimarios o eyaculados, frescos o congelados y con deposición intracervical o intrauterina (Amann y Hammersted 1993b).

La evaluación de la capacidad de atravesar el moco cervical del tracto reproductivo femenino puede evaluarse *in vitro* empleando sustitutivos de este mucus que incluyen polímeros de hialuronato como el hialuronato de sodio (NaHA, sal de sodio del ácido hialurónico); éste es un polímero hidrofílico altamente lubricante, que proporciona un efecto protector contra la sequedad (Aitken *et al.* 1992). Esta capacidad, relacionada estrechamente con la capacidad de fusionarse con el óvulo, depende del movimiento de los espermatozoides. Hay componentes concretos del movimiento que correlacionan con las tasas de penetración del moco cervical que son la velocidad promedio y la rectitud de la trayectoria y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides y que pueden estudiarse mediante la evaluación de la motilidad a través de sistemas asistidos por ordenador (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA; Stachecki *et al.* 1993, Filliers *et al.* 2008, Siemieniuch y Woclawek-Potocka 2008).

Una vez que los espermatozoides han superado la barrera cervical y penetrado en el espacio intrauterino, pueden iniciar la capacitación espermática que se completa en el istmo del oviducto. Tras la capacitación los espermatozoides están en disposición de reconocer al oocito e interactuar con las cubiertas (cumulus oophorus y zona pelúcida) e iniciar la reacción acrosómica, que tiene lugar en el ampulla del oviducto. El CASA también permite identificar el patrón de movimiento característico de la motilidad hiperactivada, que tiene lugar como parte del proceso de capacitación, lo cual resulta muy útil para muestras congeladas-descongeladas porque la congelación no sólo reduce la proporción de células con motilidad y motilidad progresiva sino que modifica la motilidad espermática, ampliándose el movimiento lateral de los espermatozoides descongelados. Pero esta evaluación tampoco sirve por sí sola para valorar el potencial fecundante de una muestra de semen, ya sea fresco o congelado-descongelado.

La interacción del espermatozoide y las cubiertas de óvulo desencadena la reacción acrosómica. El método de evaluación del estado del acrosoma varía entre especies dependiendo de las características del acrosoma y va desde la observación bajo microscopía de contraste de fase, al empleo de colorantes (Pope *et al.* 1991b, Larson y Miller 1999), o lectinas fluorescentes (Harrison y Vickers 1990, Holt 2000b, Luvoni *et al.*

2003, Silva y Gadella 2006). Para diferenciar las reacciones acrosómicas fisiológicas de aquéllas pérdidas del acrosoma debidas a otros factores pueden evaluarse conjuntamente integridad acrosómica y viabilidad de los espermatozoides, mediante colorantes, fluorocromos (Johnson *et al.* 1996, Harrison y Vickers 1990, Pukazhenthil *et al.* 1999, 2001), o un test que evalúa la capacidad del espermatozoide de hincharse en un ambiente hiposmótico o HOS test (Jeyendram *et al.* 1992).

Un test clásico, empleado por primera vez en 1972 con espermatozoides de cobaya (Yanagimachi 1972), que permite obtener información sobre diferentes aspectos funcionales de los espermatozoides y que ha sido muy empleado para verificar la capacitación espermática, es el test de penetración de oocitos de hamster libres de zona pelúcida. Este ensayo proporciona un índice cuantitativo de los espermatozoides que se capacitan, llevan a cabo la reacción acrosómica (espontánea), la fusión con la membrana perivitelina del oocito y la descondensación nuclear en el vitelo. Ha sido muy usado para evaluar espermatozoides humanos, de especies domésticas y de laboratorio y también se ha probado en felinos salvajes (Byers *et al.* 1989, Howard 1992, 1993). Sus principales limitaciones son, por una parte, que la reacción acrosómica se produce de forma espontánea y no inducida por el oocito y, por otra, que no permite evaluar la capacidad de los espermatozoides de interactuar y atravesar la zona pelúcida (Howard 1992).

Tras la reacción acrosómica los espermatozoides penetran la zona pelúcida, lo cual constituye un evento crítico de la fecundación ya que el fallo en la unión o en la penetración de la zona pelúcida es causa habitual de infertilidad. Para superar las limitaciones de los test con oocitos libres de zona pelúcida se han desarrollado ensayos que evalúan la unión (Zona pelúcida Binding Assay (ZBA)) y la penetración de los espermatozoides a la misma (Zona pelúcida Penetration Assay (ZPA)) (Larsson y Rodríguez - Martínez 2000). En estas pruebas se contabilizan los oocitos con espermatozoides unidos y/o penetrando la zona pelúcida y también, como los ensayos con oocitos libre de zona pelúcida, se han utilizado en felinos (Howard y Wildt 1990, Howard *et al.* 1991, Andrews *et al.* 1992, Donoghue *et al.* 1992a, b). El resultados de un ensayo de unión de zona pelúcida se puede presentar como el número total de espermatozoides unidos a la misma (Zhang *et al.* 1998) o como un índice de unión, calculado comparando la capacidad de unión de la muestra estudiada (número de espermatozoides unidos/oocito) en relación a la muestra de un animal control (Zhang *et al.* 1998).

Para evaluar los eventos que tienen lugar tras la penetración de la zona pelúcida se realizan ensayos de fecundación *in vitro* en los que se contabilizan los oocitos que presentan pronúcleos.

Tanto en los ensayos de unión y penetración de zona pelúcida como en los de fecundación pueden utilizarse oocitos intactos (con zona pelúcida) de la misma especie

(homóloga) o de otra diferente (heteróloga) a aquella de los espermatozoides evaluados. Los oocitos pueden ser obtenidos de los ovarios tras la esterilización de la hembra (ovariohisterectomía) o por aspiración laparoscópica *in vivo*. Para las pruebas de unión y penetración podrán emplearse oocitos maduros o inmaduros, frescos o almacenados en solución hiperosmótica. Para las pruebas de capacidad fecundante los oocitos necesariamente tendrán que haber madurado, ya sea *in vivo* o *in vitro* y además estar frescos, no en solución salina.

Los ensayos de IVF heteróloga son especialmente útiles en especies amenazadas en las que la disponibilidad de oocitos homólogos es muy limitada (Wildt 1990). Esta prueba constituye un componente crítico en los trabajos de congelación de semen ya que permite la evaluación de los aspectos secuenciales de la función espermática necesarios para la fecundación, desde la capacitación hasta la singamia o fecundación propiamente dicha (Roth *et al.* 1999). Una utilidad adicional es que permite valorar el grado en el que se han conservado los mecanismos específicos en especies relacionadas, especialmente en los eventos que aseguran la afinidad entre gametos y la consecuente fecundación (Wildt 1990). La validez de la prueba de fecundación de oocitos de gata doméstica intactos frescos con espermatozoides de felinos no domésticos se ha demostrado en varias especies (Pope *et al.* 2006, Thiangtum *et al.* 2006, Stoops *et al.* 2007, Baudi *et al.* 2008).

En general cuantos más parámetros espermáticos puedan evaluarse más precisa será la valoración que pueda hacerse acerca de la capacidad fecundante de una determinada muestra de semen y estos resultados son, estrictamente, aplicables sólo a esa muestra, ya que debido a la gran variabilidad entre eyaculados y a la tendencia de la fertilidad de los machos a variar en el tiempo parece improbable poder hacer una predicción precisa de su fertilidad tomando como referencia los resultados de test realizado puntualmente. Para poder hacerlo sería necesario un estudio longitudinal en el que se evaluara la fertilidad *in vivo* e *in vitro* periódicamente (Larsson y Rodríguez-Martínez 2000). Por otra parte, resultados negativos en estos ensayos pueden ayudar a identificar fallos en el potencial reproductor de un macho (o una muestra espermática) y decidir un plan de acción adecuado.

Criobiología espermática y otras técnicas de reproducción asistida a partir de espermatozoides criopreservados en felinos

En la década de los 70 tuvieron lugar la primera inseminación artificial y fecundación *in vitro* exitosas con espermatozoides frescos de gato doméstico (Sojka *et al.* 1970, Hamner *et al.* 1970, respectivamente). En 1976-1978 se consiguió descendencia viva mediante inseminación artificial con espermatozoides eyaculados criopreservados de gato doméstico (Platz *et al.* 1976, 1978) pero llevó varios años conseguirlo mediante fecundación *in vitro* y

aún se sigue investigando para mejorar los resultados y lograr mayores tasas de fecundación (Pope *et al.* 2006a, b). Con especies de felinos no domésticos, fue en los años 80 cuando se obtuvo por primera vez descendencia tras una inseminación artificial con semen fresco de puma (*Puma concolor*; Bonney *et al.* 1981), leopardo (*Panthera pardus*; Dresser *et al.* 1982) y tigre (*Panthera tigris*; Donoghue *et al.* 1990), y en los años 90 con semen congelado de tigre (Donoghue *et al.* 1992a) y ocelote (*Leopardus pardalis*; Swanson 1996b). En los años 90 tuvieron lugar también los primeros nacimientos mediante transferencia de embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, con semen fresco de gato de Bengala (*Felis bengalensis*; Goodrowe *et al.* 1989b), de tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*; Donoghue *et al.* 1990), de gato de la jungla (*Felis chaus*; Pope *et al.* 1993), de gato patinegro (*Felis nigripes*; Pope *et al.* 1993) y de gato pescador (*Prionailurus viverrinus*; Pope *et al.* 1993) y con semen refrigerado de gato montés (*Felis silvestris ornata*; Pope *et al.* 1989). Recientemente se ha obtenido descendencia a partir de embriones obtenidos *in vitro* con espermatozoides epididimarios congelados de león (*Panthera leo*; Bartels *et al.* 2000) y semen congelado de gato pescador (*Prionailurus viverrinus*; Pope *et al.* 2006a) y caracal (*Caracal caracal*; Pope *et al.* 2006a).

En los últimos años se ha avanzado en técnicas de reproducción asistida innovadoras como la ICSI, que permite superar limitaciones seminales severas frente a la fecundación y que se ha realizado con espermatozoides epididimarios criopreservados de gato doméstico (Bogliolo *et al.* 2001) y espermatozoides testiculares frescos de gato doméstico (Comizzoli *et al.* 2006).

En el caso de los felinos existen dificultades añadidas a la criopreservación de espermatozoides. La primera es la baja concentración espermática (Howard *et al.* 1993, Swanson 2006) y el pequeño volumen de semen que producen, en general, en cada eyaculado (Tabla 1). Cuando se parte de un número de espermatozoides reducido la pérdida de espermatozoides móviles y funcionales provocada por la criopreservación puede resultar crítica para plantear la aplicación de ARTs.

Tabla 1. Concentración, volumen y número total de espermatozoides en el eyaculado de felinos. Datos de volumen eyaculado y concentración espermática tomados de (a) Howard 1993 y (b) Pukazhenth et al. 2001. Se ha calculado el número total de espermatozoides.

Nombre común	Nombre científico	Volumen (ml)	Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	Nº total espermatozoides $\times 10^6$ /eyaculado
León ^(a)	<i>Panthera leo</i>	11,0	40,1	441,1
Tigre ^(b)	<i>Panthera tigris</i>	6,5	38,8	250,7
Leopardo ^(a)	<i>Panthera pardus</i>	2,7	38,5	103,9
Gato de la jungla ^(a)	<i>Felis chaus</i>	0,4	203,3	81,3
Gato de Geoffroy ^(a)	<i>Leopardus geoffroyi</i>	0,2	300,0	60,0
Puma ^(a)	<i>Puma concolor</i>	2,8	20,2	56,6
Gato pescador ^(a)	<i>Prionailurus viverrinus</i>	0,2	271,7	54,3
Gato doméstico ^(b)	<i>Felis catus</i>	0,2	198,0	45,5
Guepardo ^(b)	<i>Acinonyx jubatus</i>	1,5	29,3	43,9
Pantera de las nieves ^(a)	<i>Panthera uncia</i>	1,4	31,1	43,5
Caracal ^(a)	<i>Caracal caracal</i>	0,7	58,2	40,7
Pantera nebulosa ^(b)	<i>Neofelis nebulosa</i>	0,9	37,6	35,7
Jaguar ^(a)	<i>Panthera onca</i>	2,7	12,0	32,4
Gato jaspeado ^(a)	<i>Pardofelis marmorata</i>	0,2	105,5	21,1
Serval ^(a)	<i>Leptailurus serval</i>	0,5	37,1	18,5
Gato dorado ^(a)	<i>Caracal aurata</i>	0,2	87,0	17,4
Gato de Bengala ^(b)	<i>Prionailurus bengalensis</i>	0,3	55,6	16,1
Margay ^(a)	<i>Leopardus wiedii</i>	0,2	79,9	15,9
Pantera de Florida ^(b)	<i>Puma concolor coryi</i>	1,6	9,3	14,9
Lince euroasiático ^(a)	<i>Lynx lynx</i>	0,2	71,0	14,2
Gato cabeciancho ^(a)	<i>Prionailurus planiceps</i>	0,2	64,3	12,9
Gato de las arenas ^(a)	<i>Felis margarita</i>	0,1	104,3	10,4
Gato de Pallas ^(a)	<i>Otocolobus manul</i>	0,1	100,5	10,1
Ocelote ^(a)	<i>Leopardus pardalis</i>	0,3	28,0	8,4
Gato montés europeo ^(a)	<i>Felis silvestris silvestris</i>	0,3	19,0	5,7
Gato de pajonal ^(a)	<i>Leopardus colocolo</i>	0,3	10,8	3,2
Yaguarundi ^(a)	<i>Puma yagouaroundi</i>	0,1	12,5	1,3
Lince rojo ^(a)	<i>Lynx rufus</i>	0,2	3,9	0,8

La segunda limitación viene dada por la teratospermia, definida como la producción de un 60% o más de espermatozoides morfológicamente anormales en cada eyaculado (Pukazhenth et al. 2001, 2006c) y que se presenta con elevada incidencia en la familia Felidae (Howard et al. 1990) (Fig. 9). Existen especies (o subespecies) predominantemente teratospérmicas como el puma, el margay, la tigrina o el yaguarundi (Swanson et al. 2003) aunque otras son predominantemente normospérmicas, como el gato doméstico (Howard et al. 1990), el tigre (Donoghue 1992b), el jaguar (Swanson et al. 1996c) o el gato de Bengala (Howard y Wildt 1990), pero también una proporción de los machos presentan una proporción elevada de espermatozoides morfoanómalos. El fenómeno es independiente del método de recogida de espermatozoides empleado (electroejaculación o vagina artificial;

Pukazhenth et al. 2001) pero la reducción de la diversidad genética sí contribuye a la ocurrencia de teratospermia (Pukazhenth et al 2001, 2006c) como se ha visto en la pantera de Florida (Miller et al. 1990, Barone et al. 1994), el guepardo (Wildt et al. 1983, 1987a; Donoghue et al. 1992a, Roth et al. 1995), el león asiático (Wildt 1994), el leopardo (Brown et al. 1989), la pantera de las nieves (Johnston et al. 1994, Roth et al. 1994) y la pantera nebulosa (Wildt 1986a, Pukazhenth et al. 2007). Este fenómeno se ha observado en la naturaleza en poblaciones aisladas (leones: Wildt 1994) o que han sufrido cuellos de botella poblacionales en su historia evolutiva reciente (guepardo: Wildt et al. 1983, Crosier et al. 2006) y en cautividad, debido al limitado número de individuos fundadores de las que se parte en los centros zoológicos y de cría (Pukazhenth et al. 2001). También hay evidencia que indica que una baja calidad seminal, incluida baja concentración y pocos espermatozoides morfológicamente normales, puede ser provocada por la edad (machos maduros, subadultos o geriátricos podrían producir peor calidad que animales en plenitud reproductiva), estacionalidad, desórdenes endocrinológicos, una dieta inadecuada (Ulrey y Bernard 1989) o estrés (Dobson et al. 2000, 2001). No hay ninguna duda sobre que las poblaciones de felinos con porcentajes altos de espermatozoides pleiomórficos sufren baja fertilidad (Wildt 1994). Es importante saber además qué tipo de malformaciones se presentan. Resultan especialmente serias aquéllas que afectan a los acrosomas, como ocurre en el caso de la pantera de Florida, hasta el punto de considerar que sea la proporción de acrosomas deformados, más que la proporción de espermatozoides morfoanómalos totales, la causa de la baja fertilidad de la especie (Pukazhenth et al. 2001).

Existen varios sistemas de clasificación de anomalías morfológicas espermáticas (Luvoni et al. 2003). Una de las más usadas diferencia las anomalías como:

(a) Primarias o testiculares: ocurren durante la espermatogénesis, como la macrocefalia, microcefalia, bicefalia, tricefalia, cabeza piriforme, deforme o globosa, aplasia parcial o completa de las mitocondrias de la pieza intermedia y cola en ovillo. Están relacionadas con los cambios cualitativos y cuantitativos del material nuclear y de los órganos de origen citoplasmático.

(b) Secundarias: se originan después, durante la maduración y el transporte a lo largo del epididimo, como la pieza media o la cola dobladas con o sin presencia de gota citoplasmática, la presencia de gota proximal, media o distal y las cabezas desprendidas (Howard et al. 1990). Son causadas frecuentemente por procesos inflamatorios del testículo y de las glándulas sexuales accesorias y por la acción de algunos factores físicos, como el aumento o disminución de la temperatura en el testículo y por manipulación inadecuada del semen durante su procesado.

Normalmente se considera que las morfoanomalías primarias conllevan más perjuicios que las secundarias (Wildt et al. 1983, Howard et al. 1986). Las formas anómalas

predominantes son pieza media o cola dobladas con presencia o no de gota citoplasmática y colas en ovillo (Pukazhenth *et al.* 2001). La intensa actividad sexual produce un aumento de las formas anormales secundarias y, por el contrario, en animales con abstinencia sexual se encuentran espermatozoides con anomalías primarias.

Otro método para evaluar las morfoanomalías distingue las anormalidades de cabeza, pieza principal y pieza terminal, como las mencionadas anteriormente y, por separado, las colas en ovillo y la presencia de gota citoplasmática, considerado como síntoma de inmadurez de los espermatozoides en lugar de cómo anomalía morfológica (Cassinello *et al.* 1998).

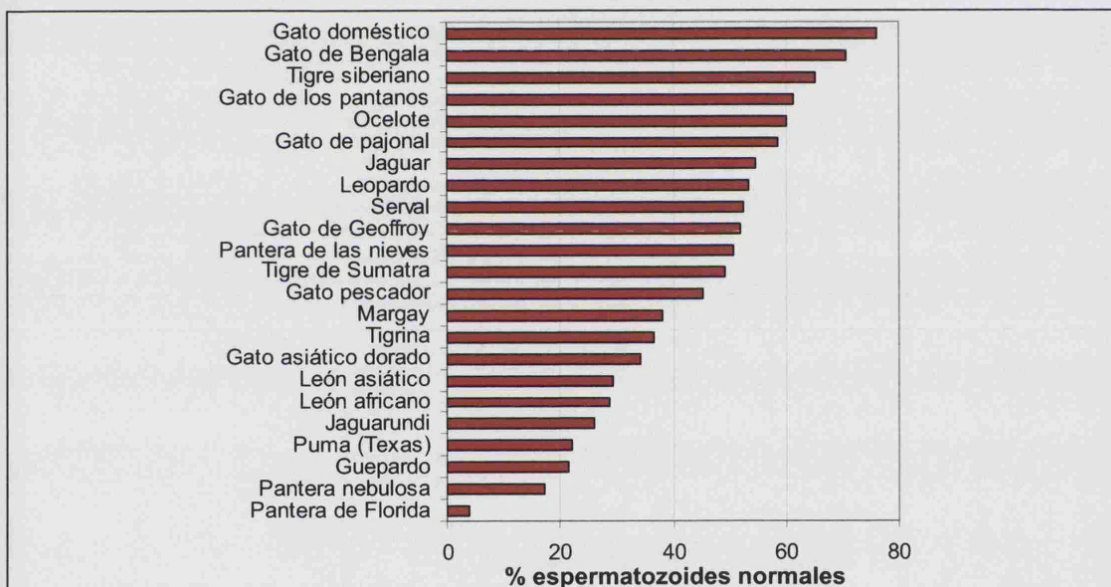


Fig. 9. Proporción media de espermatozoides normales en el eyaculado de 23 especies (o subespecies) de la familia Felidae (Pukazhenth *et al.* 2006c).

A medida que aumenta la tasa de teratospermia disminuye el rendimiento reproductivo en muchas especies (humanos, moruecos, caballos, cerdos y ratones; Howard *et al.* 1991). El incremento del número de espermatozoides pleiomórficos o defectuosos tiene un papel fundamental en la infertilidad de una serie de especies, entre ellas muchos felinos, en las que la teratospermia es una característica reproductiva común (Wildt 1991). Los espermatozoides anormales no participan en la fecundación e incluso los espermatozoides aparentemente normales de felinos domésticos o salvajes teratospérmicos, sufren defectos estructurales y tienen comprometida su funcionalidad (Howard 1993, Pukazhenth *et al.* 2001, 2006c), su capacidad para llevar a cabo capacitación y reacción acrosómica y para penetrar la zona pelúcida (Pukazhenth *et al.* 2001). Incluso algunos estudios revelan que las anormalidades en la integridad de la cromatina de los espermatozoides de individuos teratospérmicos provocan que estos fallen y no consigan fecundar o impidan que se desarrolle el embrión después de realizar ICSI

(Pukazhenthil *et al.* 2006c). Además la proporción de células con anomalías morfológicas, especialmente las referidas a la forma e integridad del acrosoma, es un factor fundamental en la supervivencia y funcionalidad de los espermatozoides durante y después de la criopreservación (Pukazhenthil *et al.* 2007), es decir que la teratospermia está relacionada con la fertilidad y con la criosensibilidad.

Objetivos



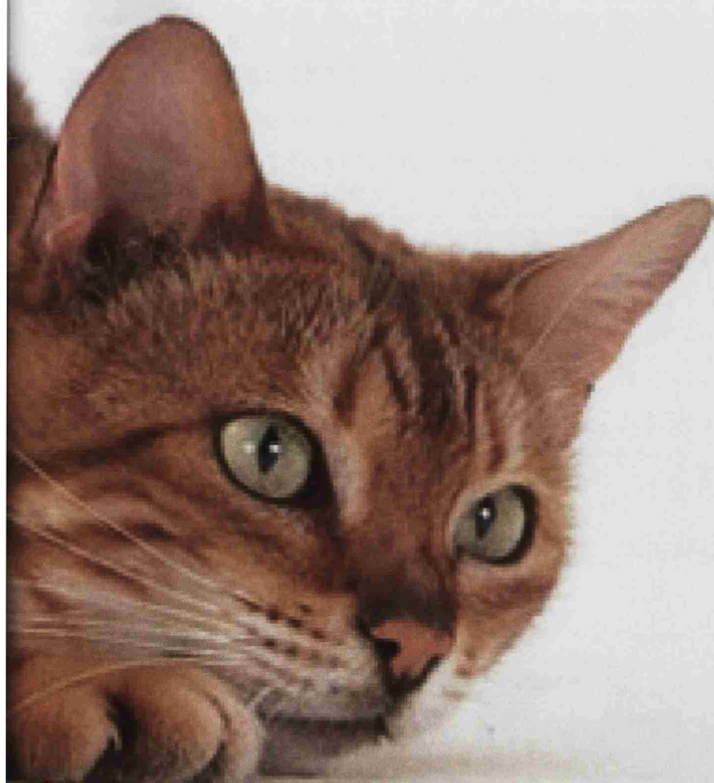
El objetivo general de esta tesis ha sido la caracterización reproductiva del macho de lince ibérico y la obtención de un protocolo de criopreservación eficaz para los espermatozoides epididimarios y eyaculados de dicha especie, de forma que puedan ser empleados en el futuro mediante técnicas de reproducción asistida favoreciendo un manejo genético adecuado y el aumento de la variabilidad genética de las poblaciones libres y cautivas de esta especie de felino críticamente amenazada.

Los objetivos específicos fueron:

- Emplear el gato doméstico como modelo para evaluar el efecto de algunos factores del proceso de criopreservación espermática sobre la motilidad, integridad acrosómica, longevidad y capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios de felinos. Estudiar la eficacia de 2 métodos de estimulación de la motilidad (swim up y añadido de pentoxifilina) sobre la tasa de fecundación *in vitro*.
- Analizar el efecto del tiempo de almacenamiento *post mortem* de los epidídimos de gato doméstico sobre la motilidad e integridad acrosómica de los espermatozoides y sobre la supervivencia de los espermatozoides a la criopreservación. Evaluar el efecto del tiempo de equilibrado de los espermatozoides con el crioprotector (glicerol) sobre la motilidad e integridad acrosómica espermática a la descongelación. Por último se ha examinado también el efecto de los dos factores mencionados (tiempo de almacenamiento de epidídimos y de equilibrado de espermatozoides) sobre la longevidad (SMI) de los espermatozoides a la descongelación.
- Analizar los parámetros espermáticos del lince rojo (bobcat), analizar la capacidad de estos espermatozoides para sobrevivir *in vitro*, evaluar diferencias en la motilidad, la integridad acrosómica y la capacidad fecundante de espermatozoides eyaculados criopreservados de esta especie en dos diluyentes de congelación.
- Caracterizar los rasgos reproductivos del macho de lince ibérico, estudiar diferencias reproductivas entre machos debidas a la edad, la forma de vida (en libertad o cautividad) o la estacionalidad, estudiar las relaciones entre diferentes parámetros seminales, caracterizar los espermatozoides epididimarios de la especie y evaluar las relaciones entre las características reproductivas de los machos y los resultados reproductivos en cautividad.
- Analizar la capacidad de los espermatozoides de lince ibérico de sobrevivir *in vitro* en varias condiciones y valorar la idoneidad de dos diluyentes de congelación de espermatozoides evaluando sus efectos sobre la motilidad, la integridad acrosómica y la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.

Capítulo 1

Factores que afectan al éxito de la congelación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico (*Felis catus*)



Resumen

La criopreservación de espermatozoides es una potente herramienta en la conservación de especies amenazadas. Las diferencias en criosensibilidad espermática entre especies y el reducido número de individuos de las especies en peligro ha generado la necesidad de utilizar especies modelo en la puesta a punto de los protocolos de criopreservación de espermatozoides para cada especie. El gato doméstico es el principal modelo experimental utilizado en la investigación de la biología de felinos salvajes amenazados. Por tanto, se ha analizado en el gato doméstico el efecto sobre la motilidad y la integridad acrosómica de varios factores implicados en el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios: diluyentes de congelación, tasas de refrigeración, método de añadido del glicerol, sistema de envasado, momento y temperatura de carga de pajuelas y sistema de congelación de pajuelas sobre vapores de nitrógeno. Los resultados indican que no se producen diferencias significativas, ni en motilidad ni en integridad acrosómica a la descongelación, debidas al uso de TEST o Biladyl, a una tasa de refrigeración de $-0,5$ ó $-0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$, al añadido de glicerol en 1 ó 3 etapas o a la carga de las pajuelas antes o después de la refrigeración. Por otra parte, resulta significativamente mejor para la motilidad a la descongelación el empleo de pajuelas que el de píldoras y la congelación en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno en lugar de en 1 nivel. El empleo de Biladyl como diluyente de congelación produce una reducción significativa en la tasa de fecundación *in vitro* con respecto al empleo de espermatozoides frescos. El "swim-up" produce una mejora significativa de la motilidad a la descongelación, pero no da lugar a un incremento significativo de la tasa de fecundación *in vitro* de oocitos de gata doméstica madurados *in vitro*. El TEST, sin embargo, es un buen diluyente de congelación para espermatozoides epididimarios de gato doméstico pues no genera diferencias significativas entre la tasa de fecundación *in vitro* en los espermatozoides criopreservados con respecto a espermatozoides frescos.

Introducción

La importancia de la criopreservación de espermatozoides como herramienta para la conservación de especies amenazadas ha sido ampliamente justificada en las últimas décadas (Wildt *et al.* 1997, Roldan y Garde 2004, Pukazhenthii *et al.* 2007, Swanson *et al.* 2007). Desde que en los años 70 se registrara la primera inseminación artificial exitosa con semen criopreservado de gato doméstico (Platz *et al.* 1976, 1978) han sido muchos los trabajos de investigación realizados con el fin de adecuar las técnicas de reproducción asistida empleando espermatozoides criopreservados a especies silvestres como el guepardo (*Acinonyx jubatus*; Swanson *et al.* 1996c, Crosier *et al.* 2006), el león (*Panthera leo*; Bartels *et al.* 2000), el tigre (*Panthera tigris*; Byers *et al.* 1989, Donoghue *et al.* 1992b, Nelson *et al.* 1999), el jaguar (*Panthera onca*; Swanson *et al.* 1996c, Nelson *et al.* 1999), el ocelote (*Leopardus pardalis*; Swanson *et al.* 1996b, Stoops *et al.* 2007, Baudi *et al.* 2008), el caracal (*Caracal caracal*; Pope *et al.* 2006a), el gato de Pallas (*Otocolobus manul*; Swanson *et al.* 2006), el gato pescador (*Prionailurus viverrinus*; Pope *et al.* 2006a, Thiangthum *et al.* 2006) o la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*; Pukazhenthii *et al.* 2006b). La puesta a punto de estos protocolos precisa de la realización de experimentos que permitan conocer cómo afectan los distintos factores implicados en la congelación-descongelación a los espermatozoides de una especie determinada. En especies amenazadas la realización de estas pruebas es muy difícil y por ello en estos casos se seleccionan modelos experimentales. Estas especies modelo son especies próximas filogenéticamente a aquéllas en peligro, habitualmente domésticas, que permiten trabajar con un número suficiente de muestras y realizar las pruebas necesarias para poner a punto las técnicas y después ajustarlas a la especie salvaje de interés (Wildt *et al.* 1986b, Swanson 2003, Pukazhenthii *et al.* 2006a). Para el estudio de la biología, en particular de la criobiología espermática, de felinos salvajes el principal modelo empleado es el gato doméstico (*Felis catus*) (Wildt *et al.* 1986b, Farstad 2000, Pope 2000, Luvoni *et al.* 2003b, Villaverde *et al.* 2008).

Se han realizado muchos trabajos que tratan de analizar el efecto de los factores que intervienen en el proceso de criopreservación de espermatozoides de gato doméstico sobre distintos parámetros espermáticos. Se ha estudiado cómo afectan estos factores a la calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la refrigeración y la congelación-descongelación en busca del mejor protocolo de conservación de espermatozoides, aquel que permita obtener, como meta del procedimiento, las mayores tasas de fecundación posibles, ya sea mediante fecundación *in vitro* (Johnston *et al.* 1991, Goodrowe y Hay 1993, Lengwinat y Blottner 1994, Kashiwazaki *et al.* 2005, Zambelli *et al.* 2006, 2008) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Bogliolo *et al.* 2001) o *in vivo*, mediante inseminación artificial (Tsutsui *et al.* 2000, 2002, Chatdarong *et al.* 2007, Villaverde *et al.* 2008), asumiendo de partida que los resultados obtenidos usando espermatozoides

criopreservados serán peores que empleando espermatozoides frescos. Son numerosos también los trabajos de revisión existentes en este contexto (Howard *et al.* 1986, Howard 1992, 1999, Goodrowe 1992, Farstad 2000, Hewitt *et al.* 2001, Luvoni *et al.* 2003a, b, Luvoni 2006, Tsutsui 2006, Pope 2006b, Howard y Wildt 2009).

Un factor fundamental en el proceso de criopreservación es la velocidad de congelación y descongelación. Los espermatozoides de las distintas especies de mamíferos muestran diferente criosensibilidad ante el choque térmico producido por las bajas temperaturas (Leibo y Bradley 1999, Holt 2000a, Roldan y Garde 2004, Fuchs *et al.* 2008). En gato doméstico se ha estudiado el efecto de las tasas de refrigeración (Pope *et al.* 1991a, Hermansson y Axner 2007), congelación (Zambelli *et al.* 2002) y descongelación (Chatdarong *et al.* 2008) sobre la motilidad, la viabilidad, la morfología, la integridad estructural o la funcionalidad de los espermatozoides a la descongelación.

Un factor relacionado con la velocidad a la que ocurren los cambios de temperatura es el tamaño y la composición del recipiente en el que se almacena la suspensión espermática (ampollas, píldoras, pajuelas o crioviales), cuya conductividad térmica influye en la curva de congelación-descongelación a la que se someten los espermatozoides. También se ha estudiado el efecto de del recipiente de almacenamiento del semen en el gato doméstico (Pope *et al.* 1991a, Minter *et al.* 2007).

Otro factor importante a tener en cuenta es la composición (osmolaridad) del diluyente de congelación ya que los cambios físico-químicos que tienen lugar durante la congelación se derivan en gran medida de la concentración de los componentes de la solución acuosa en la que se congelan los espermatozoides. De los componentes del diluyente merece especial atención el crioprotector, su naturaleza (penetrante o no), su concentración, y el tiempo y temperatura de exposición de los espermatozoides a él, que condiciona enormemente la supervivencia y funcionalidad de los espermatozoides criopreservados. Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse por etapas, es decir, aumentando o disminuyendo gradualmente su concentración en el medio de congelación, para reducir el estrés osmótico sobre la célula (Gao *et al.* 1995), o bien añadirse o extraerse en una sola vez, lo cual reduce el tiempo de exposición de las células al crioprotector, que puede resultar tóxico. El añadido o eliminación de crioprotectores gradualmente, por etapas, minimiza la pérdida de motilidad y la disrupción de membranas (Pukazhenthil *et al.* 2002). También existen estudios que analizan el efecto de los cambios osmóticos durante la criopreservación (Glover y Watson 1985, Hay y Goodrowe 1993, Pukazhenthil *et al.* 2002, Minter *et al.* 2007).

El conocimiento de los aspectos mencionados es esencial en el diseño de protocolos adecuados a nuevas especies, para dar los pasos correctos y minimizar los efectos negativos de la criopreservación.

Es importante examinar la capacidad fecundante de los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación. La fecundación *in vitro* con oocitos intactos conespecíficos a los espermatozoides evaluados representa un método útil de laboratorio para evaluar el potencial reproductor de una muestra espermática, fresca o criopreservada. Esta prueba constituye un componente crítico en los trabajos de congelación de espermatozoides ya que permite la evaluación de los aspectos secuenciales de la función espermática necesarios para la fecundación, desde la capacitación hasta la singamia (Roth *et al.* 1999).

Debido a la merma de motilidad y proporción de espermatozoides con acrosoma intacto que se produce como consecuencia de la criopreservación, con el objetivo de favorecer la fecundación en diferentes contextos de reproducción asistida se han desarrollado sistemas de procesamiento de las muestras espermáticas después de la descongelación que resultan muy útiles. Uno de ellos es el swim-up, que constituye un método de selección de espermatozoides móviles progresivos y de eliminación del glicerol y la yema de huevo del criodiluyente, los desechos celulares y los espermatozoides inmóviles. En el método de swim-up, el semen, fresco o congelado, diluido en un medio de cultivo se centrifuga, se elimina el sobrenadante cuidadosamente y se añade medio de cultivo al pellet resultante. Las muestras se incuban para permitir que los espermatozoides móviles migren al medio que ha quedado por encima del pellet. Transcurrido el tiempo de incubación se retira y evalúa la suspensión espermática obtenida. Esta técnica permite recuperar una alta proporción de espermatozoides móviles y morfológicamente normales y se ha comprobado que las muestras sometidas a swim-up presentan mayores valores de motilidad y espermatozoides normales que aquéllas que son simplemente diluidas (Howard 1990, 1993, Lengwinat y Blottner 1994, Luvoni 2006). Otros métodos que permiten incrementar la motilidad de una suspensión espermática criopreservada implican el empleo de estimulantes como la pentoxifilina. Estos estimulantes inhiben la fosfodiesterasa y producen un estímulo de la motilidad, que no va en detrimento del mantenimiento de la ésta, ni de la longevidad de los espermatozoides durante un periodo de incubación prolongado (Stachecki *et al.* 1994). Estos componentes producen un incremento en los niveles de adenosina-3'-5'-monofosfato cíclica (cAMP) intracelular, que está directamente asociado con la inducción de la capacitación espermática a la que se asocia la hiperactivación (Stachecki *et al.* 1994).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar algunos de los factores y condiciones que intervienen en el proceso de criopreservación de espermatozoides de gato doméstico, un modelo para felinos amenazados como el lince ibérico. Los experimentos realizados examinan la eficacia de la criopreservación analizando la motilidad y la integridad acrosómica de espermatozoides epididimarios de gato doméstico antes y después de la congelación empleando (a) 2 diluyentes: TEST y Biladyl, (b) 2 tasas de refrigeración: refrigeración rápida en 30 min (-0,5°C/min) y lenta en 120 minutos (-0,125°C), (c) 2 sistemas

de añadido del glicerol: en 1 vez y en 3 etapas, (d) 2 sistemas de almacenamiento: píldoras sobre hielo seco (CO_2 sólido) y pajuelas sobre vapores de nitrógeno, (e) 2 sistemas de rellenado de las pajuelas: a temperatura ambiente antes de la refrigeración y a 5°C después de la misma, y (f) 2 sistemas de congelación de pajuelas con 2 tasas de congelación: en 1 y 2 niveles sobre vapores de nitrógeno. Se ha evaluado también la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides criopreservados y la eficacia de 2 métodos de estimulación de la motilidad, el swim-up y la adición pentoxifilina, sobre la tasa de fecundación *in vitro*.

Material y Métodos

Animales

Las muestras empleadas para la realización de este trabajo procedían de machos de gato doméstico orquidectomizados en clínicas veterinarias y sociedades protectoras de animales del municipio de Madrid. Inmediatamente después de la castración los testículos y epidídimos se guardaron en una bolsa de plástico con autocierre (11 x 7 cm) y se colocaron dentro de un contenedor isotérmico (25 x 17 x 11,5 cm) que se mantuvo cerrado y a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) hasta el procesado, que se realizó entre 3 y 12 h post-cirugía. Para cada individuo se registró la edad, la raza, el peso, la fecha y hora de la cirugía así como la existencia de mono- o criptorquidismo, o la presencia de alguna enfermedad infecciosa si procedía.

Procesado del material

Una vez en el laboratorio los espermatozoides se recuperaron de los epidídimos y los conductos deferentes mediante cortes realizados en las colas epididimarias en 0,4 ml del diluyente de congelación en una placa de Petri (diámetro 35 x 10 mm). Los cortes permiten la salida de los espermatozoides hacia el diluyente. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la salida de los espermatozoides.

Recogida y evaluación de espermatozoides epididimarios

Transcurrido el tiempo de incubación en el diluyente de congelación se tomó una alícuota de 5 μl de la suspensión espermática, que se colocó entre porta y cubreobjetos precalentados (sobre una paca térmica a 37°C) y la muestra se evaluó al microscopio, sobre platina térmica a 37°C , empleando contraste de fase para valorar la motilidad y realizar una estimación de la concentración. A continuación se fijaron 5 μl de suspensión espermática en 45 μl de glutaraldehído al 1% en buffer de cacodilato 0,33M (pH 7,3) para la estimación de la concentración. Posteriormente, si la suspensión estaba muy concentrada, se realizó una dilución adicional en glutaraldehído-cacodilato. Además, se fijaron 10 μl de suspensión espermática en 250 μl de paraformaldehído al 4% (7,81 g de Na_2HPO_4 anhidro (110 mM);

0,172 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,5 mM) y 2 g de paraformaldehído en 500 ml de agua milli-Q) en un microtubo de poliestireno (0,5 ml), que se usaron posteriormente para realizar preparaciones para la evaluación de la integridad acrosómica y las morfoanomalías. El resto de la suspensión espermática se transfirió de la placa de Petri a un microtubo de poliestireno de 1,5 ml con pipeta (P200), cuidadosamente, midiendo y registrando el volumen con el fin de calcular posteriormente el número total de espermatozoides (y de espermatozoides móviles) recuperados. Se descartaron de los experimentos aquellas muestras que no tuvieron un mínimo de 40% de espermatozoides móviles y una concentración de 20×10^6 espermatozoides/ml. Los parámetros espermáticos analizados fueron:

1. Motilidad

Se analizó la motilidad individual. Se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento. La evaluación de calidad se hizo siguiendo una escala de 0 (sin movimiento) a 5 (movimiento progresivo y rápido). Con estos dos valores se calculó un Índice de Motilidad Espermática ("Sperm Motility Index", SMI).

$$SMI = \frac{\%móviles + (calidad \times 20)}{2}$$

2. Concentración espermática

Se pusieron 10 μl de la suspensión fijada con glutaraldehído-cacodilato en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se contaron como mínimo dos cuadrantes grandes opuestos de la cámara y se calculó la concentración a partir del valor promedio obtenido con el recuento y el factor de dilución empleado.

3. Integridad del acrosoma

Para la evaluación de este parámetro se empleó la alícuota fijada en paraformaldehído al 4%, que se conservó en nevera (4°C) hasta su procesamiento. Los espermatozoides fijados se centrifugaron a 1700 xg durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 μl de acetato de amonio 0,1 M (pH 9,0). Se recentrifugó a la misma velocidad y se resuspendió en 250 μl de acetato de amonio. Tras el segundo lavado se centrifugó por última vez a la misma velocidad y se eliminaron aproximadamente 200 μl del sobrenadante. Se resuspendió el pellet en el resto de sobrenadante dando pequeños golpecitos con los dedos en el vial (es decir, sin pipetear). La suspensión espermática se repartió en dos gotas que se extendieron en dos portaobjetos usando un cubreobjetos (22 x 22 mm) y se dejó secar al aire. Una vez secos, los frotis se tiñeron con 40 μl de una solución de azul de Coomassie (0,22 g de colorante en una solución compuesta por 50 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua

milli-Q) durante 90 segundos, se lavó con agua milli-Q y se dejó secar al aire. Una vez secos los frotis se montaron con unas gotas de DPX (montante para microscopía con xileno y dibutil ftalato; BDH, Madrid) y un cubreobjetos (40 x 60 mm) y se dejó secar protegido de la luz hasta la evaluación. De cada muestra se contaron 100 espermatozoides que se asignaron a cuatro categorías (Howard *et al.* 1986, Pukazhenthii 2006b) (Fig. 1.1):

- (a) Intactos normales, aquellos con la zona acrosómica teñida uniformemente de azul.
- (b) Intactos anormales, aquellos en los que se observa alguna zona del acrosoma teñida más intensamente de azul que el resto.
- (c) Dañados, aquellos en los que se observan vesículas, abultamientos, o desprendimientos parciales de la membrana en la región acrosomal.
- (d) Con acrosoma perdido, aquellos espermatozoides en los que la región acrosomal no aparece coloreada. En la mayoría de los casos puede observarse teñida ligeramente de azul la banda ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

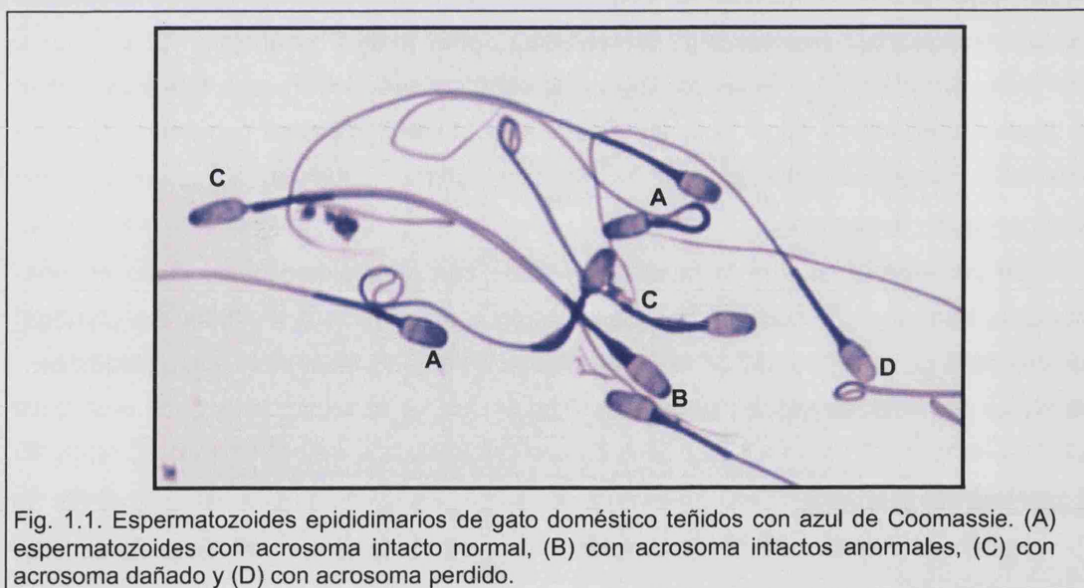


Fig. 1.1. Espermatozoides epididimarios de gato doméstico teñidos con azul de Coomassie. (A) espermatozoides con acrosoma intacto normal, (B) con acrosoma intactos anormales, (C) con acrosoma dañado y (D) con acrosoma perdido.

4. Morfoanomalías

En los frotis de espermatozoides teñidos con azul de Coomassie se contaron 100 espermatozoides (aparte de los examinados para la evaluación de integridad acrosómica) que se clasificaron como normales, con cabeza anormal (piriforme o deformada, macro/microcéfalo, bi/tricéfalo), cabezas sueltas (normales y anormales), pieza media anormal (aplasia parcial o total, doblada con o sin gota citoplasmática) y pieza principal/terminal anormal (cortada, doblada con o sin gota citoplasmática). Se contaron aparte los flagelos sueltos. Además de estos patrones morfológicos se evaluó la madurez de los espermatozoides tomando como criterio la presencia o no de gota citoplasmática

clasificando los espermatozoides con gota proximal, con gota media, con gota distal o sin gota y se contaron aparte los espermatozoides con la cola enrollada en ovillo.

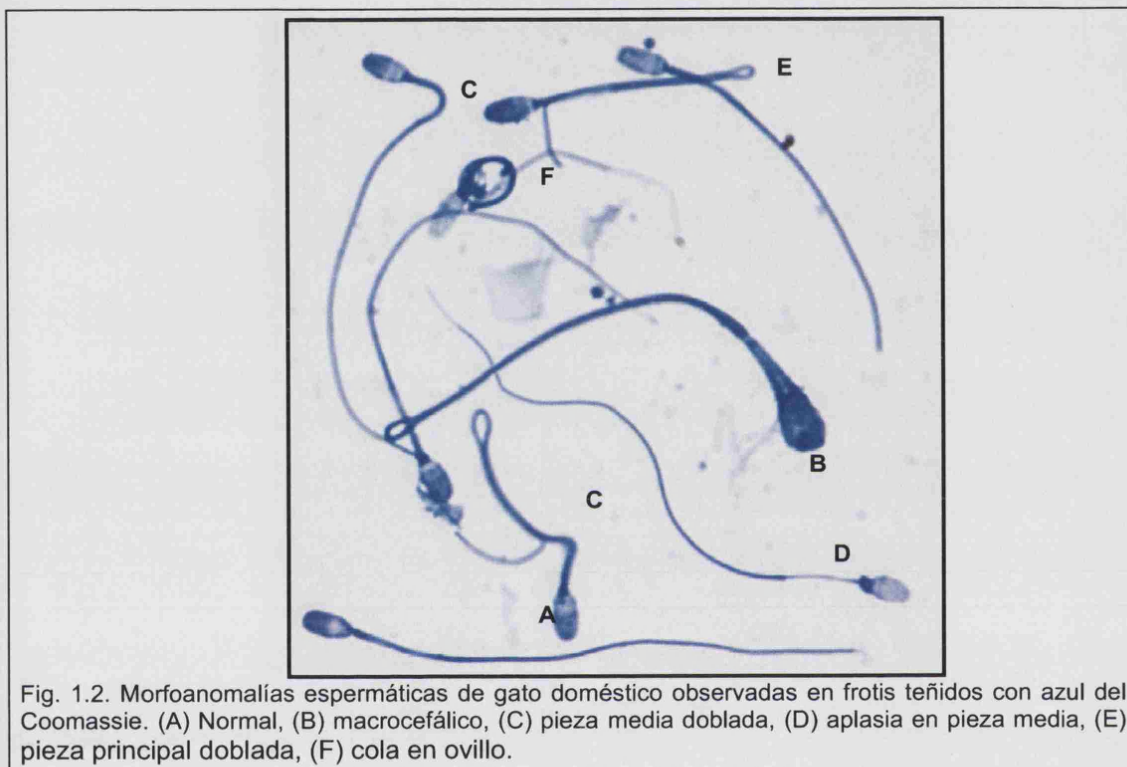


Fig. 1.2. Morfoanomalías espermáticas de gato doméstico observadas en frotis teñidos con azul del Coomassie. (A) Normal, (B) macrocefálico, (C) pieza media doblada, (D) aplasia en pieza media, (E) pieza principal doblada, (F) cola en ovillo.

Cuantificación de niveles de testosterona y cortisol

Se recogieron muestras de sangre que se centrifugaron para la obtención de suero y se almacenaron a -80°C . El suero se empleó para cuantificar la concentración de testosterona y cortisol mediante enzima inmunoensayo competitivo de quimioluminiscencia en fase sólida (Immulite® 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Criopreservación de espermatozoides

Las muestras se asignaron al azar a diferentes grupos experimentales para examinar varios aspectos del proceso de criopreservación.

1. Diluyentes de congelación

Se han utilizado dos diluyentes de congelación, TEST y Biladyl. Ambos contienen 20% de yema de huevo y una concentración final de 4% de glicerol y difieren en el resto de los componentes (Tabla 1.1).

Para la preparación de Biladyl con 4% glicerol se partió de la preparación comercial (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) que viene en 3 fracciones: (1) solución A (49 g con 0%

glicerol), (2) solución B (250 g con 14% glicerol), y (3) cocktail AB (antibióticos). Para obtener Biladyl con una concentración de 8% glicerol, se diluyó en la siguiente proporción: Solución B 57.14 ml + solución A 42,86 ml. La mezcla de partes iguales de Biladyl 0% glicerol y Biladyl 8% glicerol resultó en una solución de Biladyl al 4%. Además de TEST con 4% glicerol, se prepararon también dos soluciones de TEST, una con 0% glicerol y otra con 8% glicerol. Estas tres soluciones se emplearon para poder realizar el añadido de glicerol de una vez antes de la refrigeración (TEST 4% glicerol), cuando el diluyente se añade en un paso, o por etapas al término de la refrigeración, cuando el diluyente se añade en 2 pasos (TEST con 0% y 8% de glicerol).

Tabla 1.1. Composición de los diluyentes de congelación

Componentes	TEST	Biladyl
Tes	4,83%	
Tris	1,15%	2,42%
Glucosa	0,4%	
Fructosa		1,00%
Acido cítrico		1,38%
Yema de huevo	20%	20%
Glicerol (*)	4%	4%
Penicilina (u.i./ml)	200-1000	200-1000
Estreptomicina (µg/ml)	200-1000	200-1000
pH	7,2	7,0
Osmolaridad (mOsmol/Kg)	360	340

(*) 4% es la concentración final de glicerol. Ambos diluyentes, TEST y Biladyl, se utilizan con concentraciones de glicerol del 0%, 4% y 8%. El añadido del diluyente se ha realizado en 1 paso, con 4% de glicerol antes de la refrigeración, o en 2 pasos. En este estudio, cuando el diluyente se añade en 2 pasos, el glicerol se añade, al final de la refrigeración, en 3 etapas. La osmolaridad se midió antes de la adición de glicerol.

2. Refrigeración

Se evaluaron dos tasas de refrigeración:

- Rápida, refrigerando los espermatozoides de 20°C a 5°C en 30 min (-0,5 °C/min): Se colocó un microtubo con la suspensión espermática dentro de un recipiente estéril con 150 ml de agua milli-Q, que se introdujo en un congelador (-20 °C) durante 30 min, tiempo en el cual la temperatura de la muestra pasa de 20°C a 5°C (Figs. 1.3, 1.4).
- Lenta, llevando la suspensión espermática de 20°C a 5°C en 120 min (-0,125°C/min): La suspensión espermática (dentro de un vial o ya contenida en las pajuelas) se dispuso sobre una gradilla flotante dentro de un recipiente isotérmico con 1 litro de agua a temperatura

ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) y se logró un descenso de temperatura añadiendo hielo, hielo seco, o agua fría, a tiempos preestablecidos hasta alcanzar los 5°C (Figs. 1.3, 1.4).

Finalizada la refrigeración, a partir de una alícuota mantenida en un microtubo y refrigerada en iguales condiciones que la muestra que se congeló, se tomaron muestras para evaluar la motilidad y la integridad acrosómica post-refrigeración (Tabla 1.2).

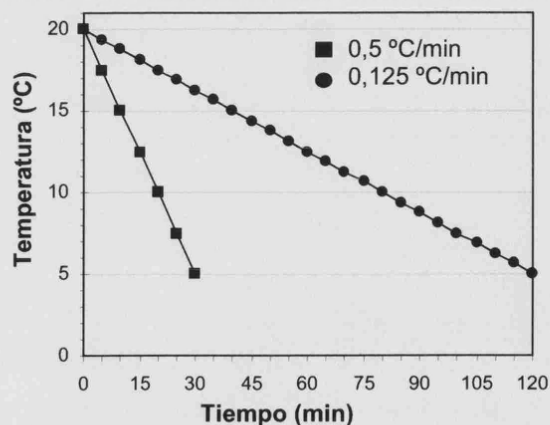
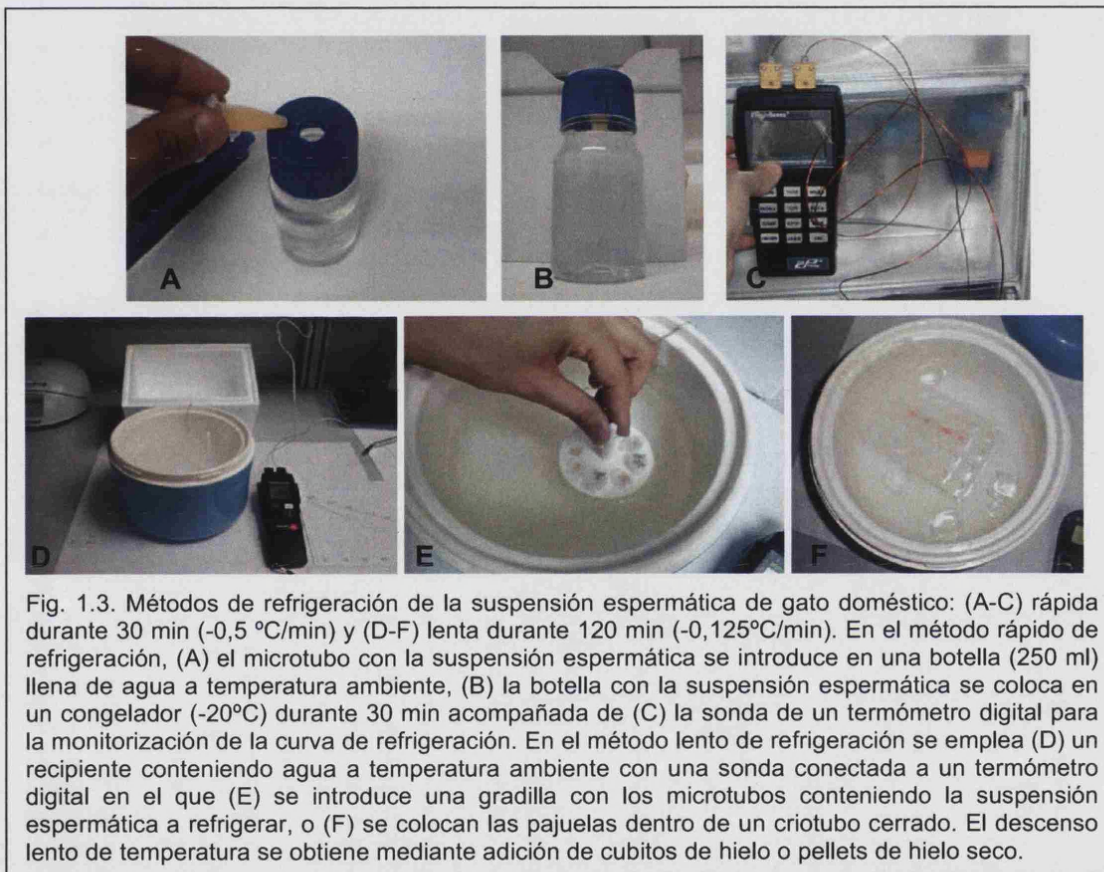


Fig. 1.4. Curvas de refrigeración empleadas con espermatozoides de gato doméstico: rápida durante 30 min ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y lenta durante 120 min ($-0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

3. Añadido de glicerol

Se examinaron dos formas de añadir el glicerol:

- (a) De una vez (en un paso), desde el principio del proceso, a temperatura ambiente, mediante la extracción de los espermatozoides en diluyente conteniendo 4% de glicerol.
- (b) Por etapas, extrayendo los espermatozoides en diluyente de congelación con 0% glicerol e incorporando diluyente con 8% de glicerol al final de la refrigeración (a $\sim 5^{\circ}\text{C}$) dentro de una cámara fría para evitar oscilaciones de temperatura en la muestra. En este caso el diluyente se incorporó en 2 pasos. El proceso consiste en añadir el diluyente con 8% glicerol hasta alcanzar una dilución 1:1 de la suspensión espermática inicial en diluyente con 0% glicerol, de forma que la concentración final de glicerol sea del 4%. El volumen de diluyente con 8% glicerol se añade en 3 etapas, con 1/4, 1/4 y 1/2 del volumen total a añadir, a intervalos de 15 min.

4. Sistema de envasado

Transcurrido el tiempo de refrigeración la muestra se congeló en píldoras sobre hielo seco (CO_2 sólido a -79°C) o en pajuelas sobre vapores de nitrógeno, según correspondiese (las muestras se asignaron al azar a los distintos tratamientos).

- (a) Píldoras: se dispuso previamente un bloque de nieve carbónica en el que se practicaron pequeñas perforaciones con un molde construido empleando un bloque de madera y clavos recortados a los que se les ha eliminado la cabeza. En cada uno de los pocillos se colocaron 30 μl de suspensión espermática (Fig. 1.5).



Fig. 1.5. Envasado de suspensión espermática en forma de píldoras. (A) Molde para hacer huecos en hielo seco, (B) Bloques de hielo seco con pocillos, (C) Volcado de suspensión espermática (30 μl) en los pocillos para congelación.

- (b) Pajuelas: se emplearon pajuelas de 0,25 ml (Minitüb), cortadas por la mitad con unas tijeras y de las que se eliminó el extremo sin algodón. En cada pajuela se cargaron 50 μl de suspensión espermática con una pipeta (P200) y después un poco de aire girando el émbolo de la pipeta y desplazando la columna de suspensión espermática hacia el centro de la

pajuela. Tras el llenado se cerró cada una de las pajuelas con un sellador térmico (ERSA, Minitüb) y una pinza (Fig. 1.6).

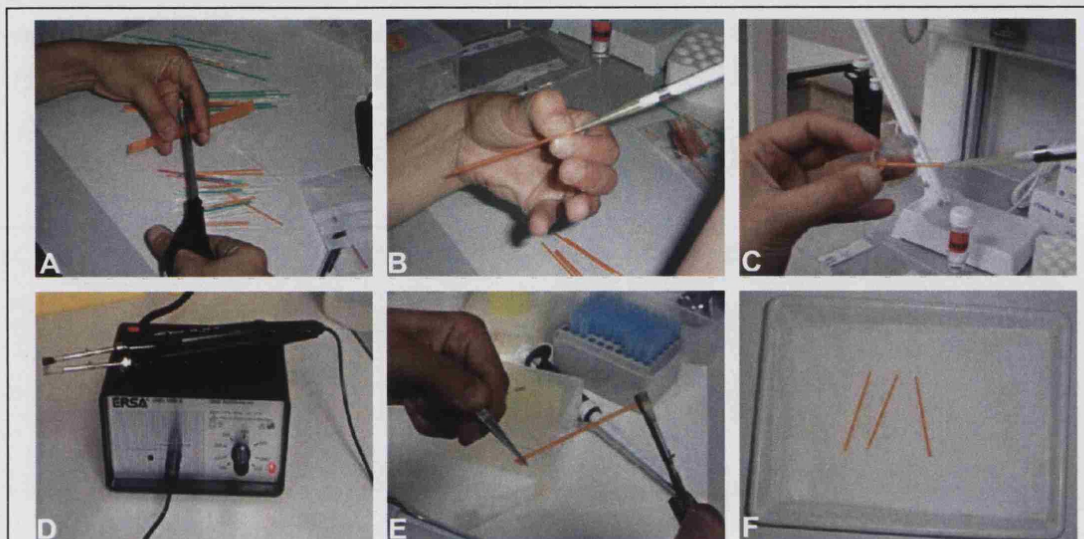


Fig. 1.6. Carga de la suspensión espermática en pajuelas. (A) Corte de pajuelas por la mitad, (B) colocación de la pajuela en la pipeta (a través de una punta), (C) carga de la pajuela, (D) sellador térmico, (E) sellado de la pajuela, (F) pajuelas selladas antes de congelar.

5. Temperatura y momento de carga de las pajuelas

Se establecieron dos condiciones experimentales distintas:

(a) Rellenado de las pajuelas a temperatura ambiente, antes de la refrigeración (Fig. 1.6): una vez tomadas las alícuotas para la evaluación de parámetros en fresco, las pajuelas se cargaron, se sellaron y se colocaron en un criovial (5 ml; 7,5 cm de longitud) que se puso sobre una gradilla flotante en un baño a temperatura ambiente para la refrigeración (Fig. 1.3F). Dentro del criovial se introdujo la sonda de un termómetro digital para monitorizar el descenso de temperatura real (que varía ligeramente con el del agua del baño) al que están sometidas las muestras.

(b) Rellenado a 5°C después de la refrigeración: una vez tomadas las alícuotas para la evaluación de parámetros en fresco, la suspensión espermática restante se mantuvo en un microtubo y se colocó en una gradilla flotante dentro de un baño a temperatura ambiente para la refrigeración (Fig. 1.3E). Sobre la gradilla se colocó también la sonda de un termómetro digital para monitorizar el descenso de temperatura al que estaba sometida la suspensión a esa profundidad del baño. Una vez que la temperatura de la suspensión espermática ha alcanzado los 5°C, la carga de las pajuelas se realizó en una cámara fría a la misma temperatura, con un procedimiento tal como se describe en el párrafo anterior (ver Fig. 1.6).

6. Congelación

Se han comparado dos sistemas:

(a) Píldoras: la suspensión espermática se deposita en los orificios sobre hielo seco y se dejó congelar durante 3 min. Transcurrido ese tiempo las píldoras se volcaron a nitrógeno líquido (Howard *et al.* 1986) y se guardaron en crioviales (2 ml; 3,5 cm de longitud) perforados y rotulados. Los crioviales se colocaron en cañas etiquetadas que se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido (Fig. 1.7).

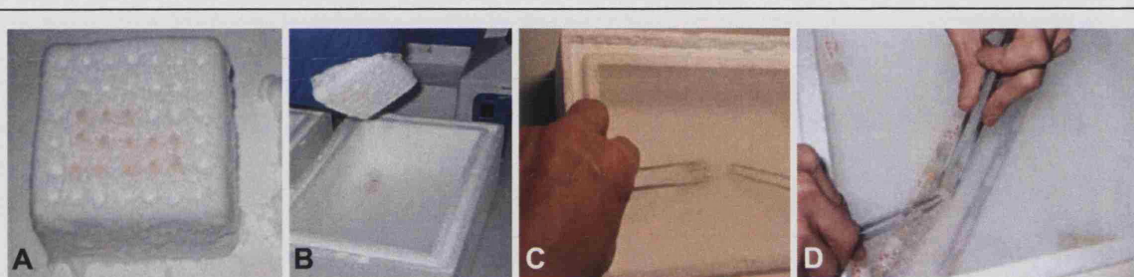


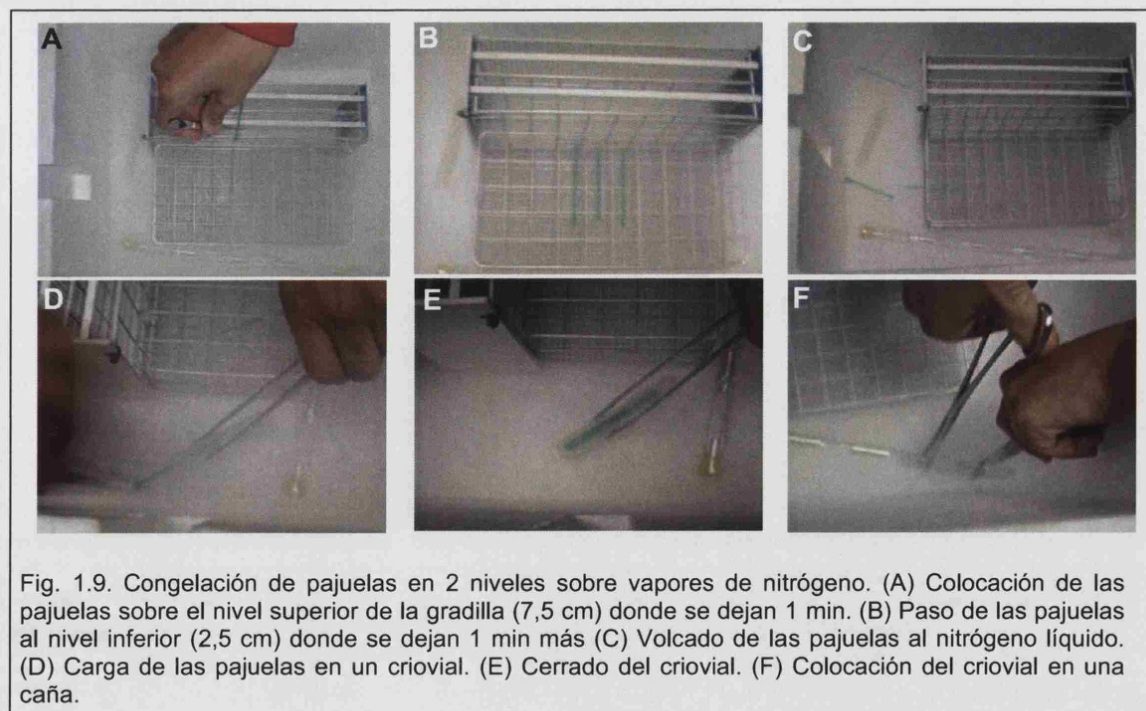
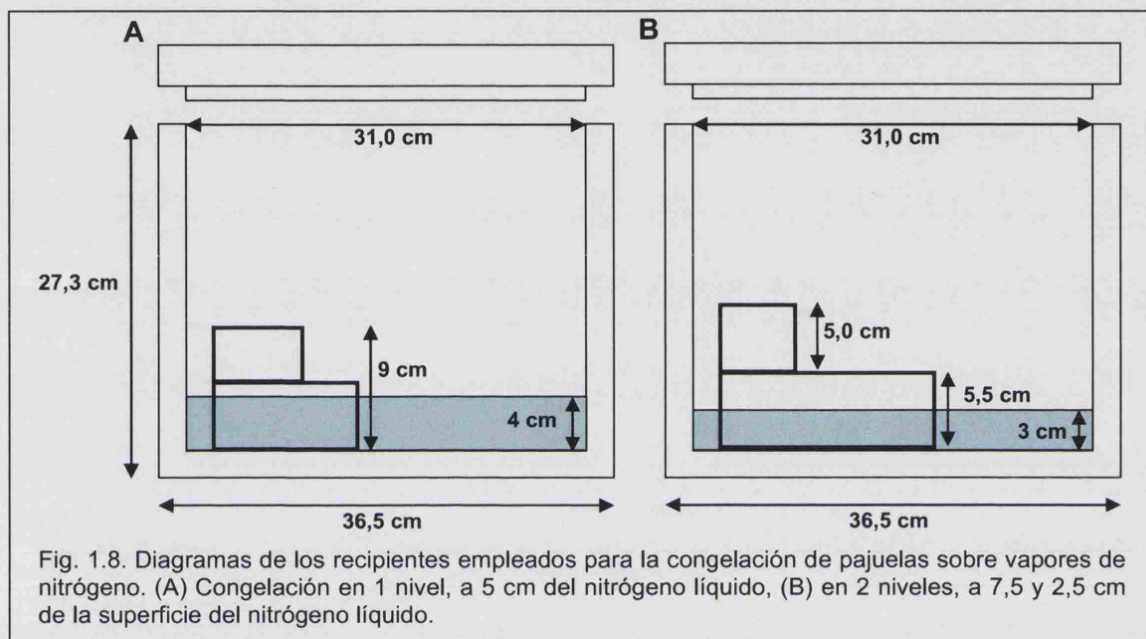
Fig. 1.7. Congelación de suspensión espermática en píldoras. (A) Las píldoras permanecen durante 3 min en huecos en un bloque de hielo seco. (B) Volcado de píldoras congeladas a nitrógeno líquido. (C) Carga de las píldoras en un criovial. (D) Colocación de los crioviales en una caña.

(b) Pajuelas: se congelaron sobre vapores de nitrógeno. Se examinaron dos métodos de congelación de pajuelas (Figs. 1.8, 1.9):

b.1. Sistema en un nivel: en una caja de poliestireno expandido se volcó nitrógeno líquido hasta conseguir 4 cm de profundidad (Fig. 1.8). Se introdujo en la caja una gradilla metálica de una altura tal que permitió congelar las pajuelas en los vapores de nitrógeno, a 5 cm sobre la superficie de nitrógeno líquido. Antes de congelar las pajuelas, la caja se tapó durante 5 min para que se equilibrara la temperatura de los vapores dentro de ella. Se colocaron las pajuelas sobre la gradilla y se dejaron durante 10 min con la tapa de la caja cerrada. Transcurrido el tiempo de congelación las pajuelas se volcaron en nitrógeno líquido y se guardaron en crioviales (5 ml; 7,5 cm de longitud) etiquetados, que se colocaron en cañas también etiquetadas, para su almacenamiento en un tanque de nitrógeno líquido (Fig. 1.9).

b.2. Sistema en dos niveles (Figs. 1.8, 1.9): se empleó la misma caja de poliestireno expandido utilizada para el sistema anterior, pero el nitrógeno líquido se rellenó hasta alcanzar una profundidad de 3 cm. Se empleó un sistema de gradillas que permitió congelar las pajuelas en los vapores de nitrógeno primero a 7,5 y después a 2,5 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido. Para la congelación las pajuelas permanecieron en el nivel superior (7,5 cm) durante 1 min y transcurrido este tiempo se pasaron, en el mismo orden en el que se habían colocado en el primer nivel, y con una pinza preenfriada, al segundo nivel (2,5 cm) donde se dejaron 1 min más (Pukazhenthil *et al.* 2007). Una vez congeladas las

pajuelas se volcaron al nitrógeno líquido y se guardaron en crioviales (5 ml; 7,5 cm de longitud) etiquetados, que se colocaron en cañas también etiquetadas, para su almacenamiento en un tanque de nitrógeno líquido (Fig. 1.9).



Valoración de espermatozoides a la descongelación

Se utilizó medio F-10 de Ham al que se añadió un suplemento para el medio F-10 de Ham (Gentamicin-50X. Irvine Scientific, catálogo 1290127, Izasa), que se suministra liofilizado y proporciona una concentración final (al diluir 1:50) de 1 mM de glutamina, 1mM de piruvato y 10 µg/ml de gentamicina. Además se suplementó con suero fetal bovino inactivado (5%), L-glutamina (0,292 mg/ml), piruvato (0,110 mg/ml) y antibióticos (130 u.i. penicilina/ml, 130 µg estreptomicina/ml y 260 µg neomicina/ml). Cuando la muestra descongelada iba a ser utilizada para realizar una fecundación *in vitro* se utilizó medio de Tyrode en lugar de medio F-10 de Ham.

Para descongelar las muestras se dispuso una batea con nitrógeno líquido, un baño de agua a 37°C y un bloque térmico también a 37°C con microtubos (1,5 ml) estériles. El criovial que contenía las píldoras o las pajuelas se transfirió del tanque de nitrógeno líquido donde estaba almacenado a la batea con nitrógeno líquido y allí se extrajo la píldora o pajuela a descongelar.

Para descongelar cada píldora se utilizó un tubo de vidrio (12 x 75 mm) con 120 µl del medio de descongelación. Los tubos se colocaron en el baño de agua a 37°C. Se extrajo la píldora de la batea de nitrógeno con unas pinzas previamente enfriadas y se pasó rápidamente a uno de los tubos con medio de descongelación precalentado que se mantuvo durante 30 segundos dentro del baño, agitándolo muy suavemente para favorecer la dilución y homogeneización de la suspensión. Transcurridos los 30 segundos la suspensión espermática se transfirió muy lentamente, con una pipeta, del tubo de vidrio a un microtubo precalentados que se mantuvo cerrado en un bloque térmico, a 37°C.

Las pajuelas se descongelaron dentro de un vaso de precipitados con solución fisiológica (NaCl 0,9%, p/v) estéril que a su vez estaba colocado dentro de un baño de agua a 37°C. Tras extraer la pajuela de la batea con nitrógeno, sujetándola con unas pinzas por el extremo que tiene el algodón, se secó 10 segundos al aire y después se introdujo en el recipiente, sin soltarla de la pinza, durante 30 segundos, agitándola cuidadosamente. Transcurrido este tiempo se sacó la pajuela del baño y se secó con papel, se cortó el extremo que se había sellado con calor, se colocó boca abajo en el fondo de uno de los microtubos precalentados y se cortó el otro extremo para que el contenido de la pajuela cayese en el vial. Una vez que toda la suspensión espermática estaba dentro del tubo se le añadieron, muy lentamente, gota a gota, 150 µl del medio F-10 de Ham con suero y antibióticos, dando pequeños golpecitos para ayudar a homogeneizar la suspensión final diluida. Se tomaron 5 µl de suspensión espermática diluida para la evaluación de la motilidad y se fijaron 10 µl de la misma con paraformaldehído al 4%, para su posterior tinción y evaluación de la integridad acrosómica. La muestra sobrante se incubó durante 4,5 h a 37°C en atmósfera de aire en un bloque térmico. Se tomaron alícuotas para evaluación de

motilidad e integridad acrosómica, a intervalos de 1 h, a partir de los 90 min desde la descongelación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Etapas del proceso de criopreservación en los que se toman muestras para evaluación de motilidad e integridad acrosómica.

Momentos (etapas) del proceso de criopreservación	
1	En fresco, después de la extracción del epidídimo
2	Después de la refrigeración
3	Después de la descongelación
4	Transcurrida 1,5 h de incubación post-descongelación
5	Transcurridas 2,5 h de incubación post-descongelación
6	Transcurridas 3,5 h de incubación post-descongelación
7	Transcurridas 4,5 h de incubación post-descongelación

Recogida y maduración in vitro de oocitos

Los ovarios de gatas domésticas ovariectomizadas se obtuvieron de clínicas veterinarias y se transportaron al laboratorio, en un tubo de 15 ml con 5 ml de solución salina (NaCl 0,9%, p/v) suplementada con penicilina-estreptomicina (100 µg/ml de cada una). Los tubos con los ovarios se mantuvieron refrigerados (5°C), dentro de una caja de poliestireno expandido con un acumulador de frío precongelado. Los ovarios que no se procesaron inmediatamente se conservaron a 4 - 8°C hasta su procesamiento posterior antes de 24 h post-cirugía. Las muestras se procesaron según Gómez *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Los ovarios se dividieron sagitalmente con un bisturí y los folículos antrales presentes en la superficie ovárica se punzaron con ayuda de un par de agujas del calibre 21 insertadas en jeringuillas de insulina para liberar los complejos cúmulo-oocito (COCs). Para la recogida de los COCs se utilizó el medio TCM-199 (Sigma, M-5017), suplementado con 15 mM de Hepes, 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 0,4% (v/v) de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, A-8412) y penicilina-estreptomicina (100 µg/ml de cada una). Tras varios lavados en el TCM-199 con Hepes, se seleccionaron los COC de grado I a III (grado I: excelente calidad; grado II: bueno; grado III: aceptable) y se colocaron en una placa de cultivo con 4 pocillos (Nunc, Nalgene, Nunc International, Roskilde, Denmark) con 500 µl de TCM-199 suplementado con 25 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 1,12 mM de cisteína, 0,4% (p/v) de BSA (Fracción V, Sigma, A-9418), 25 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma, E-4127) (Merlo *et al.* 2005), FSH (F-8174) y LH (L-5269) ovinas (Sigma, Madrid, España, 10 µg/ml de cada), 1 µg/ml de estradiol (E-2247), penicilina-estreptomicina (100 µg/ml cada una). Las placas se cultivaron en una atmósfera con 5% CO₂ en aire a 38,5°C y humedad máxima durante 24 h.

Preparación de los espermatozoides para la fecundación in vitro

Con el objetivo de mejorar la calidad de los espermatozoides a la descongelación, dada la merma de motilidad y de la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto que se produce como consecuencia de la criopreservación, se han llevado a cabo dos experimentos para intentar mejorar la calidad de la suspensión espermática, empleando en el primero medios físicos y en el segundo medios bioquímicos.

1. Efecto de la centrifugación y swim-up

Los espermatozoides, una vez descongelados y diluidos, se centrifugaron (400 g, 8 min), se eliminó el sobrenadante y se añadió al pellet 100 µl de medio de Tyrode (sin Hepes, igual al empleado para la fecundación *in vitro*). Se incubó durante 30 min en 5% CO₂/aire a 38,5°C y humedad máxima y transcurrido este tiempo se retiraron 75 µl de la porción superior de la suspensión espermática. De esta fracción, se evaluó la motilidad y se fijó una alícuota para el posterior estudio de la integridad acrosómica. El resto de la suspensión se incubó durante 2 h en las mismas condiciones. Se evaluó motilidad e integridad acrosómica a la hora y las 2 h de incubación posteriores al swim-up (2,5 h post-descongelación). De cada muestra descongelada se realizó centrifugación y swim-up de una alícuota y se diluyó otra que se procesó como control.

2. Efecto del añadido de un estimulante de la motilidad

La suspensión espermática, una vez descongelada, se dividió en dos alícuotas. Ambas muestras se diluyeron (1:1 v/v) con medio de Tyrode (sin Hepes, como el empleado para la fecundación *in vitro*). El medio empleado para una de las alícuotas se suplementó con pentoxifilina (1mM concentración final) mientras que la otra alícuota carecía de pentoxifilina y se usó como control. Se evaluó la motilidad y se fijó una alícuota de cada submuestra para el posterior estudio de la integridad acrosómica. Las suspensiones espermáticas se incubaron durante 1 h en una atmósfera de 5% CO₂/aire a 38,5°C y humedad máxima. Transcurrido este tiempo se reevaluaron la motilidad y la integridad acrosómica.

Fecundación in vitro homóloga de oocitos madurados in vitro con espermatozoides epididimarios de gato doméstico congelados-descongelados

Tras 24 h de maduración *in vitro*, los oocitos de gata doméstica se coincubaron con espermatozoides epididimarios de gato doméstico descongelados. Como control de partenogénesis una parte de los oocitos se incubó en las mismas condiciones pero sin espermatozoides. Para la fecundación, los oocitos se colocaron en gotas de 50 - 100 µl (10 - 20 oocitos/ gota), en una placa de Petri, empleando solución de Tyrode suplementada con

15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM de lactato de calcio, 1 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina (100 µg/ ml de cada) y 0,6% (p/v) BSA (libre de ácidos grasos, Calbiochem) (Gómez *et al.* 2003; Pope *et al.* 2006a). La coincubación de gametos se realizó, bajo aceite mineral, con una concentración de 4×10^5 espermatozoides móviles/ml, en una atmósfera de 5% CO₂/aire a 38,5°C y humedad máxima durante 18 - 20 h.

Cultivo in vitro

Después del cocultivo con los espermatozoides, los oocitos se pipetearon cuidadosamente para desprender las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos y se lavaron tres veces con solución de Tyrode tamponada con Hepes. Los presuntos cigotos se transfirieron a un placa de cultivo de 4 pocillos con 500 µl de solución de Tyrode con 1% amino ácidos no esenciales de medio MEM, 0,3% (p/v) BSA (libre de ácidos grasos) y suplementado con 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM lactato de calcio, 1 mM de glutamina y penicilina-estreptomicina (100 µg/ ml de cada una) (Gómez *et al.* 2003; Pope *et al.* 2006a). El cultivo se llevó a cabo en una atmósfera de 5% CO₂/aire a 38,5°C y humedad máxima. La división de los embriones se evaluó a las 44 - 48 h post-inseminación. Los oocitos no divididos se tiñeron con Hoechst 33342 (10 µg/ml) en glicerol (1:9, v/v) para evaluar el grado de maduración, la fecundación y el número de espermatozoides adherido a la zona pelúcida (ZP). Finalizada la incubación (hasta 7 días) los embriones se tiñeron con Hoechst 33342 y se evaluaron para determinar el número total de núcleos.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Los datos se analizaron con la versión 11.5 de SPSS. Los resultados se presentan como media±error estándar de la media (SEM). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para analizar las diferencias interanuales en los parámetros espermáticos se utilizó ANOVA de un factor y contrastes post-hoc de Games-Howell.

Para analizar si había diferencias estacionales y entre años se realizó un ANOVA bifactorial incluyendo año y época como factores.

En todos los análisis de factores del proceso de criopreservación se utilizó split-plot ANOVA con un factor de medidas repetidas (MR), el tiempo, desde la muestra en fresco (1) hasta la incubación post-descongelación (4, 5, 6 y 7) (Tabla 1.2), y un factor fijo completamente aleatorizado (CA) que ha sido en cada estudio el factor cuyo efecto se quería estudiar sobre el índice de motilidad espermática (SMI) y el % de espermatozoides con acrosoma intacto. Los factores fueron el diluyente (TEST o Biladyl), la velocidad de refrigeración (durante 30 ó 120 min), el sistema de almacenamiento (pajuelas o píldoras), el sistema y momento de añadido del glicerol (de 1 vez antes de la refrigeración o en 3 etapas al terminar la refrigeración), la temperatura y momento de carga de las pajuelas (antes de la

refrigeración a temperatura ambiente o después de la refrigeración a 5°C) y el sistema de congelación (en 1 ó 2 niveles sobre vapores de nitrógeno).

Para el estudio de las interacciones entre factores se utilizó ANOVA split-plot con el tiempo como factor de medidas repetidas y dos factores inter-sujeto. De este modo se examinó si existían interacciones entre los dos factores, entre cada uno de ellos con el tiempo y entre los tres.

Para el estudio de la relaciones entre parámetros espermáticos en muestras frescas, entre parámetros espermáticos en muestras frescas y descongeladas y entre parámetros espermáticos en muestras después de la descongelación se realizaron correlaciones de Pearson.

Para estudiar las diferencias entre tratamientos en % oocitos fecundados se utilizó, un ANOVA de un factor y contrastes post-hoc de Tukey.

Resultados

Caracterización de los espermatozoides epididimarios de gato doméstico

1. Descripción de parámetros espermáticos

Durante los tres años de muestreo incluidos en este estudio se ha trabajado con animales sexualmente maduros (Tsutsui *et al.* 2004) y, en general, jóvenes (promedio $1,5 \pm 0,12$ años, siendo el 31% de los animales menores de 1 año y el 30% de 1 año de edad). El número de espermatozoides obtenidos de los epidídimos ($28,2 \pm 3,2 \times 10^6$ espermatozoides totales) presentó marcadas diferencias entre machos (rango 0,5 - $302,4 \times 10^6$ espermatozoides totales). La motilidad fue muy uniforme durante el período estudiado, tanto en % de espermatozoides móviles ($55,6 \pm 1,2\%$), como en la calidad de la motilidad ($2,8 \pm 0,07$) y en consecuencia, en SMI ($55,7 \pm 1,0$). En relación a la motilidad se observaron también grandes diferencias entre machos (rango de variación del SMI: 17,5 - 85,0). El valor medio encontrado de porcentaje de espermatozoides normales ($30,95 \pm 1,98\%$) permite definir la muestra de gato doméstico de este estudio como teratospérmica, es decir, con menos de un 40% de espermatozoides normales. Sólo el 25,8% de los machos presentaron una proporción igual o superior al 40% de espermatozoides normales. Las proporciones de espermatozoides normales fueron significativamente diferentes ($p < 0,01$) en el grupo normospérmico ($63,36 \pm 2,74\%$; $N=33$) y en el teratospérmico ($19,43 \pm 0,89\%$; $N=95$). También en relación a este parámetro las diferencias entre individuos fueron muy marcadas, particularmente en el año 2004 (rango 7 - 90% de espermatozoides normales). De todas las morfoanomalías encontradas la más frecuente es la que afecta a las piezas principal y terminal del flagelo ($36,7 \pm 2,15\%$ de espermatozoides). En segundo lugar, por orden de frecuencia, se han hallado anomalías en la pieza media del flagelo ($27,7 \pm 1,6\%$ de espermatozoides). Se ha encontrado menos de un 2% de anomalías de cabeza, con un

valor máximo del 11% encontrado en un macho en el año 2004. La mayoría de las veces esta la anomalía de cabeza es la microcefalia. Por último, se ha encontrado un porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto cercano al 60% ($57,69 \pm 1,40\%$) también con un amplio rango de variación (11 - 88%) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Características de los espermatozoides epididimarios de gato doméstico evaluados durante el período 2004-2006 tras su recuperación en diluyente de congelación.

	2004	2005	2006	Media \pm SEM
Número de machos	55	45	34	134
Edad (años)	$1,56 \pm 0,15$	$1,66 \pm 0,32$	$1,37 \pm 0,16$	$1,54 \pm 0,13$
Nº total espermatozoides ($\times 10^6$)	$25,80 \pm 2,73$	$37,64 \pm 8,36$	$19,06 \pm 3,47$	$28,15 \pm 3,23$
Motilidad (%)	$57,18 \pm 2,21$	$54,33 \pm 1,76$	$54,56 \pm 2,20$	$55,56 \pm 1,21$
Calidad (escala 0-5)	$2,85 \pm 0,11$	$2,91 \pm 0,13$	$2,54 \pm 0,10$	$2,79 \pm 0,07$
Índice Motilidad Espermática (SMI)	$57,14 \pm 1,78$	$56,28 \pm 1,74$	$52,72 \pm 1,67$	$55,73 \pm 1,03$
Espermatozoides normales (%)	$44,38 \pm 3,77^a$	$20,30 \pm 1,52^b$	$23,30 \pm 2,09^b$	$30,95 \pm 1,98$
Morfoanomalías de cabeza	$2,44 \pm 0,51$	$0,87 \pm 0,21$	$0,90 \pm 0,23$	$1,41 \pm 0,21$
Morfoanomalías de pieza media	$23,47 \pm 2,40$	$33,64 \pm 2,87$	$25,13 \pm 2,90$	$27,72 \pm 1,63$
Morfoanomalías de pieza principal y Terminal	$28,33 \pm 3,74$	$39,23 \pm 3,29$	$43,47 \pm 3,80$	$36,70 \pm 2,15$
Colas en ovillo	$2,78 \pm 0,77$	$5,97 \pm 1,45$	$4,56 \pm 1,46$	$4,62 \pm 0,77$
Presencia de gota citoplasmática	$38,32 \pm 5,27$	$27,63 \pm 3,21$	$16,60 \pm 2,76$	$27,89 \pm 2,38$
Acrosomas intactos (%)	$60,06 \pm 2,27^a$	$50,64 \pm 2,27^b$	$63,63 \pm 2,16^a$	$57,69 \pm 1,40$

Letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre columnas (años).

Se han encontrado diferencias significativas en la concentración de testosterona en suero en los animales adultos y enteros con respecto a los animales más jóvenes (6-8 meses) y a los adultos castrados (Tabla 1.4). No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de cortisol circulante entre machos adultos (enteros o castrados) y machos jóvenes.

Tabla 1.4. Concentración de testosterona y cortisol en suero en machos de gato doméstico jóvenes y adultos, enteros y castrados.

	Machos ≥ 1 año enteros (N=13)	Machos 6-8 meses enteros (N=4)	Machos ≥ 1 año castrados (N=5)
Edad (años)	$3,19 \pm 0,88$	$0,55 \pm 0,03$	$4,6 \pm 1,18$
Testosterona (ng/ml)	$2,52 \pm 0,51^a$	$0,60 \pm 0,13^b$	$0,36 \pm 0,09^b$
Cortisol (μ g/dl)	$2,5 \pm 0,63$	$3,95 \pm 2,27$	$6,64 \pm 2,75$

Letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre columnas.

2. Diferencias interanuales

La producción espermática no varió significativamente entre años (Tabla 1.3). Tampoco se han encontrado diferencias interanuales en el % de espermatozoides móviles, la calidad de la motilidad o el SMI. Se han encontrado diferencias significativas entre años en el % de espermatozoides normales ($p < 0,01$) y el % espermatozoides con acrosoma intacto ($p < 0,01$). Las diferencias en la proporción de espermatozoides normales se produjeron entre el año 2004 ($44,38 \pm 3,77\%$) y los otros dos años de muestreo ($20,30 \pm 1,52\%$ y $23,30 \pm 2,09\%$ en 2005 y 2006, respectivamente). En el % de acrosomas intactos es el año 2005 ($50,6 \pm 2,3\%$) el que difiere significativamente de los otros dos ($60,1 \pm 2,3\%$ y $63,6 \pm 2,2\%$ en 2004 y 2006, respectivamente) (Tabla 1.3).

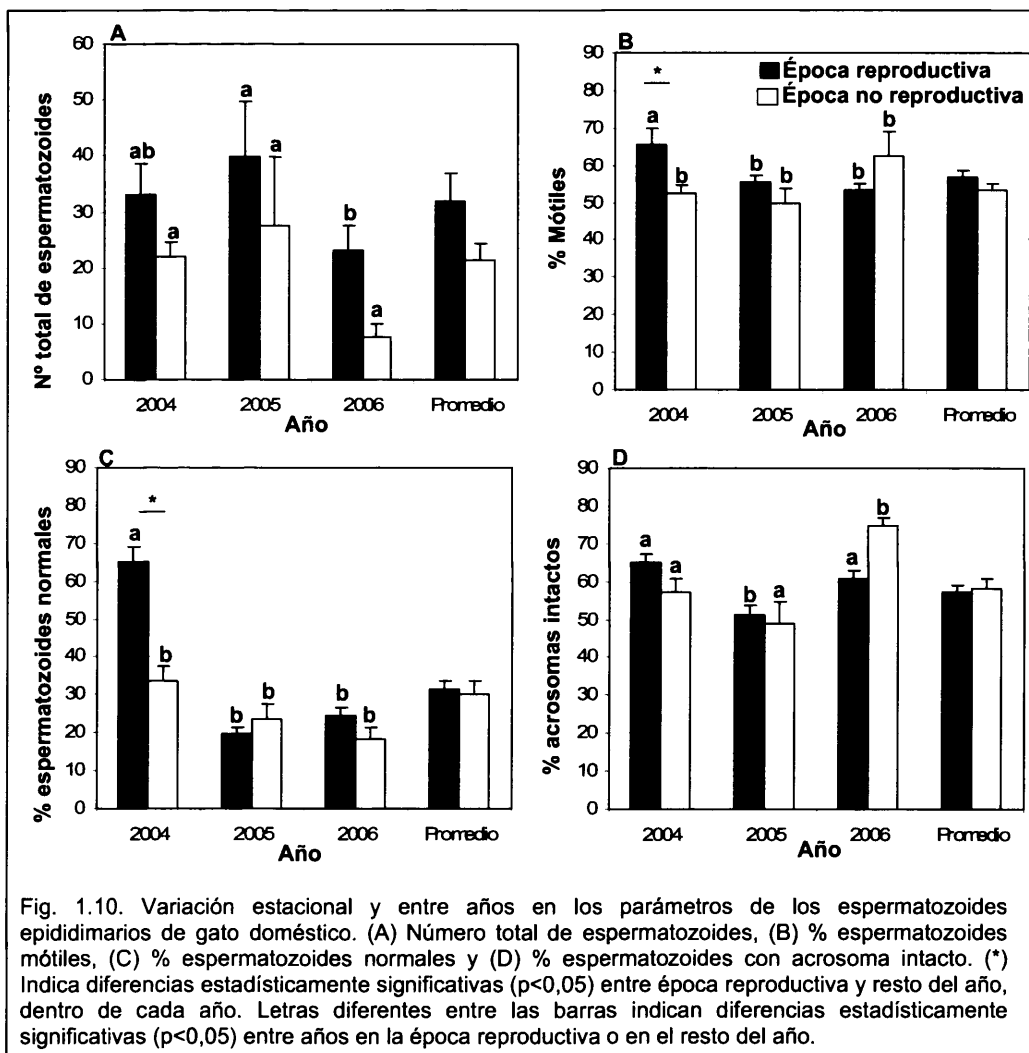
3. Diferencias estacionales en los parámetros espermáticos

Para estudiar diferencias entre la estación reproductiva y el resto del año se ha definido primero dicha estación. Se tomó como estación reproductiva de referencia aquella definida por las hembras (el rango de meses en los que éstas se muestran receptivas y se producen cópulas) que se estimó a partir de los meses en los que se producen los nacimientos, utilizando la información recogida sobre las muestras, y el tiempo de gestación (promedio de 67 días; Root *et al.* 1995), de forma que se ha podido estimar el momento en el que ocurren las concepciones. Se evaluó cómo se distribuyeron los promedios mensuales de número total de espermatozoides, el % de espermatozoides móviles, el % de espermatozoides normales y el % de espermatozoides con acrosoma intacto a lo largo de los 3 años del estudio.

El número total de espermatozoides comenzó a incrementarse, notable aunque no significativamente, en enero, alcanzándose los valores máximos en marzo y volviendo a descender en junio, aunque tampoco significativamente respecto a los meses anteriores. El descenso continuó progresivamente hasta el mes de noviembre, en el que empezó a ascender de nuevo. La motilidad se mantuvo muy estable a lo largo de todo el año con valores ligeramente mayores en mayo. El % de espermatozoides normales presenta valores considerablemente más altos entre los meses de mayo y julio que el resto del año, dándose diferencias próximas al 50% entre estos meses y el mes de septiembre. El valor máximo en % de acrosomas intactos se observó en abril y el mínimo durante junio-octubre, pero las diferencias entre meses, una vez más, no fueron significativas.

Teniendo en cuenta la información recogida para las hembras y los machos, se definió como estación reproductiva el período enero - junio. Se analizó si existían diferencias entre la época reproductiva y el resto de meses dentro de cada año y entre épocas reproductivas o no reproductivas de los distintos años. No se encontraron diferencias dentro y fuera de la época reproductiva cuando se consideraron todos los años en conjunto (Fig.

1.10). Sin embargo, se encontraron diferencias dependiendo del año. En 2004 hubo diferencia significativa dentro y fuera de la época reproductiva en el % de espermatozoides móviles ($65,75 \pm 4,08\%$ y $52,29 \pm 2,22\%$, respectivamente) y en el % de espermatozoides normales ($65,06 \pm 4,06\%$ y $57,43 \pm 3,20\%$, respectivamente), con valores más altos en la época reproductiva que fuera de ella. No hubo diferencias significativas entre épocas para ningún parámetro espermático ni en 2005 ni en 2006. Se encontraron diferencias interanuales significativas en la época reproductiva para todos los parámetros (Fig. 1.10). Fuera de la época reproductiva, sin embargo, aparecen diferencias interanuales sólo en el % de espermatozoides con acrosomas intactos entre 2006 ($74,83 \pm 2,21\%$) y los otros dos años muestreados ($57,43 \pm 3,20\%$ y $48,75 \pm 5,79\%$ en 2004 y 2005, respectivamente).



Si en lugar del período enero-julio, se considera como estación reproductiva el período febrero - julio, tal como se hizo en un estudio reciente (Blottner y Jewgenow 2007) en el que se concluye que existe una moderada estacionalidad reproductiva de los machos de gato doméstico, los resultados obtenidos indican la existencia de diferencias entre estación reproductiva y el resto del año en el % de espermatozoides normales ($66,69 \pm 2,30\%$ y $20,04 \pm 2,35\%$, respectivamente) en 2004, en la calidad de la motilidad ($2,74 \pm 0,14$ y $3,27 \pm 0,19$, respectivamente) y el % de espermatozoides con acrosoma intacto ($47,93 \pm 2,74\%$ y $57,73 \pm 3,81\%$, respectivamente) en 2005 y en el % de espermatozoides con acrosoma intacto ($66,83 \pm 3,01\%$ y $44,75 \pm 7,37\%$, respectivamente) en 2006.

Relación entre parámetros espermáticos en fresco

Se ha estudiado la existencia de relaciones entre parámetros espermáticos en las muestras en fresco. Se hizo el análisis para el total de casos estudiados y se encontró relación positiva significativa ($p < 0,01$) entre el % de espermatozoides móviles (y del SMI) y el % de espermatozoides con acrosoma intacto ($p < 0,01$; $N=142$).

En estudios anteriores (Neubauer *et al.* 2004) se propuso la existencia de una relación positiva significativa entre la producción de espermatozoides y la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado. Los autores de este estudio afirman que los individuos teratospérmicos producen una mayor cantidad de espermatozoides totales en cada eyaculado. Para contrastar estos resultados, en el presente estudio se han evaluado los gatos teratospérmicos (aquellos con un % de espermatozoides normales $< 40\%$) y se ha examinado esta posible relación. Los resultados muestran que no existe una correlación significativa entre el número total de espermatozoides y el % de espermatozoides normales en ninguno de los años de muestreo.

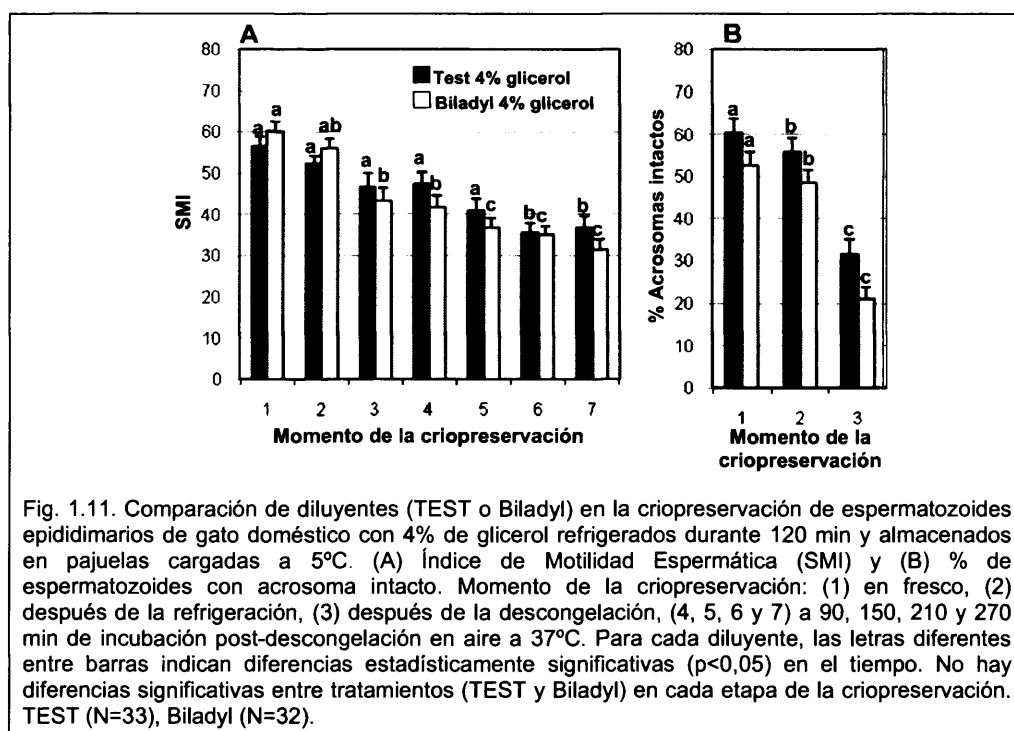
Efecto del criodiluyente: TEST o Biladyl

Se han estudiado las diferencias en motilidad y % de espermatozoides con acrosoma intacto en muestras espermáticas epididimarias de gato doméstico extraídas y criopreservadas en TEST o Biladyl, ambos con 4% de glicerol, refrigeradas hasta 5°C durante 120 min, y almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C (Fig. 1.11).

Se observó un descenso del índice de motilidad espermática (SMI) y del % de espermatozoides con acrosoma intacto durante la criopreservación en ambos diluyentes. Sólo en las muestras extraídas en Biladyl hubo un descenso significativo en el SMI entre las muestras en fresco ($60,0 \pm 2,4$) y a la descongelación ($43,4 \pm 3,1$) y este descenso se acentuó a lo largo de la incubación post-descongelación ($31,4 \pm 2,7$ a las 4,5 h de incubación). En las muestras en TEST el descenso en SMI con respecto a la muestra en fresco ($56,4 \pm 2,3$) no apareció hasta las 3,5 h de incubación post-descongelación ($35,5 \pm 2,5$) (Fig. 1.11A).

Independientemente de que los espermatozoides se hubieran extraído en TEST o Biladyl, el % de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó significativamente con respecto a la muestra en fresco ($60,5 \pm 3,1\%$ y $52,5 \pm 3,2\%$, respectivamente), tras la refrigeración ($55,8 \pm 3,3\%$ y $48,5 \pm 3,0\%$, respectivamente) y a la descongelación ($31,7 \pm 3,6\%$ y $21,0 \pm 2,9\%$, respectivamente) (Fig. 1.11B).

No se encontraron diferencias significativas a la descongelación entre las muestras conservadas en TEST o Biladyl, ni en los valores de SMI ($46,8 \pm 3,2$ y $43,4 \pm 3,1$, respectivamente) ni en % de espermatozoides con acrosoma intacto ($31,7 \pm 3,6\%$ y $21,0 \pm 2,9\%$, respectivamente) (Fig. 1.11).



Efecto de la velocidad de refrigeración: $-0,125$ ó $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Para evaluar el efecto de la velocidad de refrigeración sobre el índice de motilidad espermática (SMI) y el % de espermatozoides con el acrosoma intacto se compararon muestras extraídas en TEST con 4% glicerol, y refrigeradas lenta ($-0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$) o rápidamente ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), y almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C y congeladas en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno (Fig. 1.12).

En las muestras refrigeradas durante 30 min ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ó 120 min ($-0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$) el SMI fue descendiendo poco a poco hasta las 4,5 h de incubación post-descongelación ($37,5 \pm 5,4$ y $44,3 \pm 4,0$, respectivamente) momento en el que se observó un descenso

significativo con respecto a la muestra después de la descongelación ($50,0 \pm 4,3$ y $59,2 \pm 4,2$, respectivamente) (Fig. 1.12A). El % de espermatozoides con acrosoma intacto después de descongelar descendió significativamente tanto en las muestras refrigeradas durante 30 min ($-0,5$ °C/min) como durante 120 min ($-0,125$ °C/min) ($31,3 \pm 6,6\%$ y $40,3 \pm 7,8\%$, respectivamente) en relación a la muestra en fresco ($68,1 \pm 5,3\%$ y $64,4 \pm 3,1\%$, respectivamente). El descenso fue más brusco y acusado en las muestras refrigeradas durante 30 min y por ello, en este caso, se encontró además una caída significativa del % de acrosomas intactos a la descongelación ($31,3 \pm 6,6\%$) en relación a los valores observados al finalizar la refrigeración ($63,0 \pm 6,6\%$) (Fig. 1.12B).

No se encontraron diferencias significativas en SMI o en el % de acrosomas intactos entre las dos tasas de refrigeración estudiadas ($-0,5$ y $-0,125$ °C/min) en ninguno de los momentos de proceso de criopreservación considerados (Fig. 1.12).

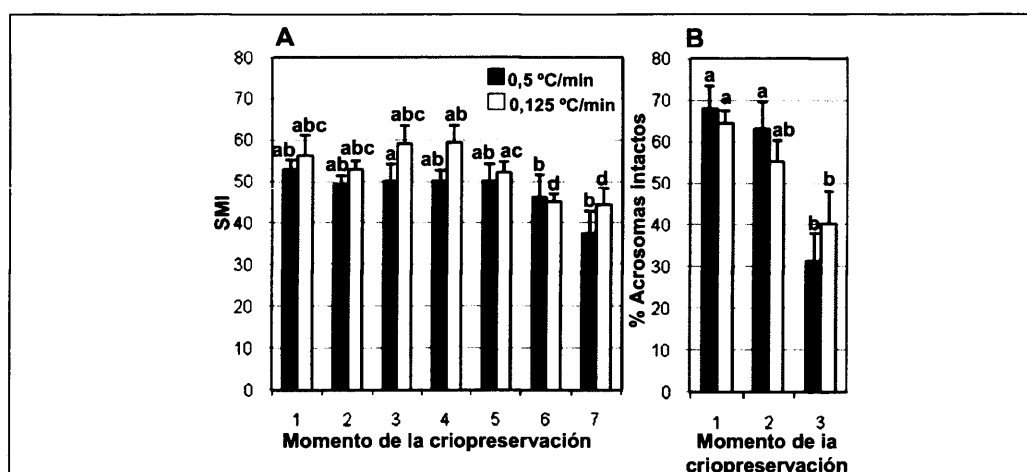


Fig. 1.12. Efecto de la tasa de refrigeración ($-0,5$ y $-0,125$ °C/min) sobre la motilidad y el % de espermatozoides con acrosoma intacto de espermatozoides de gato doméstico suspendidos en TEST con 4% de glicerol, almacenado en pajuelas cargadas a 5°C y congeladas en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno. (A) Índice de Motilidad Espermática (SMI) y (B) % de espermatozoides con acrosoma intacto. Momento de la criopreservación: (1) en fresco, (2) después de la refrigeración, (3) después de la descongelación, (4, 5, 6 y 7) 90, 150, 210 y 270 min de incubación post-descongelación en aire a 37°C. Para cada tasa de refrigeración, las letras diferentes entre barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre tasas de refrigeración ($-0,5$ vs $-0,125$ °C/min) en ningún momento de la criopreservación (N=21).

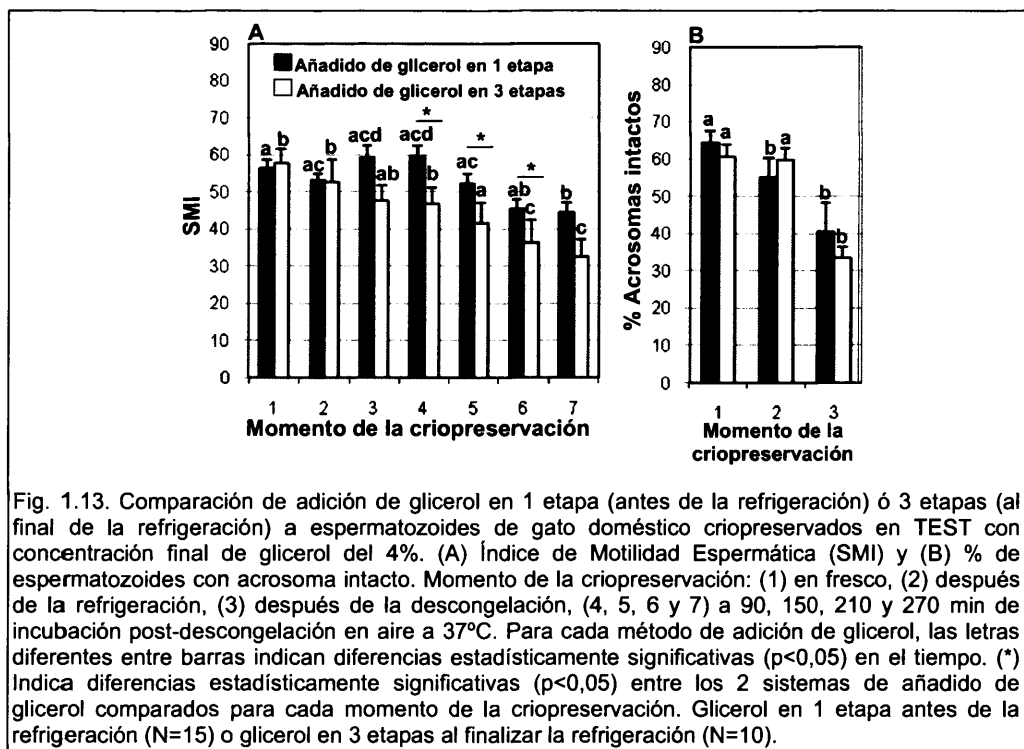
Añadido de glicerol en 1 ó 3 etapas

Para evaluar el efecto sobre la motilidad y la integridad acrosómica producido por el sistema de adición del glicerol a la suspensión espermática, se compararon las muestras extraídas en TEST con 0% glicerol y adición gradual de TEST 8% glicerol en 3 etapas al final de la refrigeración, con muestras extraídas en TEST con 4% glicerol (es decir, con exposición al glicerol antes y durante la refrigeración). Todas las muestras fueron

refrigeradas lentamente (0,125 °C/min), almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C y congeladas sobre 2 niveles en vapores de nitrógeno líquido (Fig. 1.13).

No se observó un descenso significativo en los valores del SMI a lo largo de proceso de criopreservación hasta las 2,5 horas de incubación post-descongelación, independientemente del sistema de añadido de glicerol utilizado, momento a partir del cual se produjo una acusada bajada de la motilidad hasta el final de la incubación post-descongelación (Fig. 1.13A).

Se encontró, sin embargo, un descenso significativo en el % de espermatozoides con acrosoma intacto entre las muestras en fresco (64,4±3,1% y 60,5±2,9% para las muestras a las que se les añadió el glicerol antes y después de la refrigeración, respectivamente) y aquellas observadas después de la descongelación (40,3±7,8% y 33,3±3,5%, respectivamente), con independencia del sistemas de añadido de glicerol empleado. Además se encontró un descenso significativo entre las muestras en fresco y aquellas después de la refrigeración cuando el glicerol se añadió antes de la refrigeración (64,4±3,1% y 55,1±5,3%, respectivamente) y entre la muestra después de la refrigeración y después de la descongelación cuando se añadió el glicerol finalizada la refrigeración (59,8±3,4% y 33,3±3,5%, respectivamente) (Fig. 1.13B).



Al comparar las muestras a las que se les añadió el glicerol de una vez (antes de la refrigeración) y aquellas a las que se les añadió en tres etapas (al final de la refrigeración) no se observaron diferencias al finalizar la refrigeración, ni en SMI, ni en % de acrosomas intactos. El SMI promedio finalizada la refrigeración fue de $53,0 \pm 2,0$ y $52,5 \pm 6,2$ y el % de espermatozoides con acrosoma intacto de $55,1 \pm 5,3\%$ y $59,8 \pm 3,4\%$ para las muestras a las que se les añadió el glicerol antes y después de la refrigeración, respectivamente (Fig. 1.13). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los dos métodos de adición de glicerol al observar las muestras después de la descongelación. Los SMI promedio después de descongelar fueron de $59,2 \pm 4,2$ y $47,5 \pm 4,2$ y los % de espermatozoides con acrosoma intacto de $40,3 \pm 7,8\%$ y $33,3 \pm 3,5\%$ para las muestras a las que se les añadió el glicerol antes y después de la refrigeración, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los dos sistemas de adición de glicerol cuando las muestras se incubaron después de la descongelación. Se observaron diferencias en el SMI a partir de 1,5 h ($59,4 \pm 4,0$ y $46,8 \pm 4,5$, para las muestras a las que se les añadió el glicerol antes y después de la refrigeración, respectivamente), que se mantuvieron a las 2,5 h ($52,2 \pm 2,4$ y $41,4 \pm 5,6$), a las 3,5 h ($45,3 \pm 1,6$ y $36,4 \pm 5,9$, respectivamente) y a las 4,5 h ($44,3 \pm 4,0$ y $32,5 \pm 4,7$, respectivamente) de incubación post-descongelación (Fig. 1.13A).

Efecto de método de envasado: pajuelas o píldoras

Para estudiar los efectos sobre la motilidad y la integridad acrosómica del método de envasado (píldoras o pajuelas) de una suspensión espermática se utilizaron muestras extraídas en TEST con 4% de glicerol, refrigeradas a 5°C durante 120 min (Fig. 1.14).

No se encontró descenso en SMI a la descongelación con respecto a la suspensión espermática en fresco en las muestras congeladas en pajuelas ($59,2 \pm 4,2$ y $56,3 \pm 4,8$, respectivamente) pero sí se observó en las congeladas en píldoras ($33,6 \pm 2,4$ SMI a la descongelación y $49,2 \pm 2,0$ SMI en fresco) (Fig. 1.14A). Se observó un descenso significativo en el % de espermatozoides con acrosoma intacto entre las muestras descongeladas y frescas, tanto en las muestras congeladas en pajuelas ($40,3 \pm 7,8\%$ y $64,4 \pm 3,1\%$, respectivamente) como en las congeladas en píldoras ($27,6 \pm 4,7\%$ y $60,4 \pm 3,7\%$, respectivamente) (Fig. 1.14B).

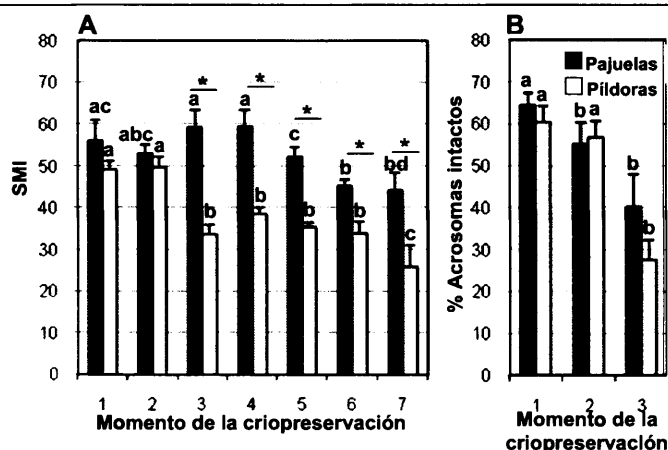


Fig. 1.14. Comparación de sistemas de almacenamiento (pajuelas o píldoras) de espermatozoides de gato doméstico criopreservados en TEST con 4% de concentración final de glicerol, refrigerados durante 120 min. (A) Índice de Motilidad Espermática (SMI) y (B) % de espermatozoides con acrosoma intacto. Momento de la criopreservación: (1) en fresco, (2) después de la refrigeración, (3) después de la descongelación, (4, 5, 6 y 7) a 90, 150, 210 y 270 min de incubación post-descongelación en aire a 37°C. Diferentes letras entre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el tiempo (1-7), para cada sistema de almacenamiento (pajuelas o píldoras). (*) Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre píldoras y pajuelas (N=19).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en SMI entre pajuelas y píldoras a la descongelación ($59,2 \pm 4,2$ y $33,6 \pm 2,4$, respectivamente) que se hicieron más marcadas durante la incubación post-descongelación ($44,3 \pm 4,0$ y $25,8 \pm 5,1$, respectivamente, a las 4,5 h de incubación) (Fig. 1.14A). No se encontraron, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas en el % de espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación entre las muestras congeladas en pajuelas o en píldoras ($40,3 \pm 7,8\%$ y $27,6 \pm 4,7\%$, respectivamente) (Fig. 1. 14B).

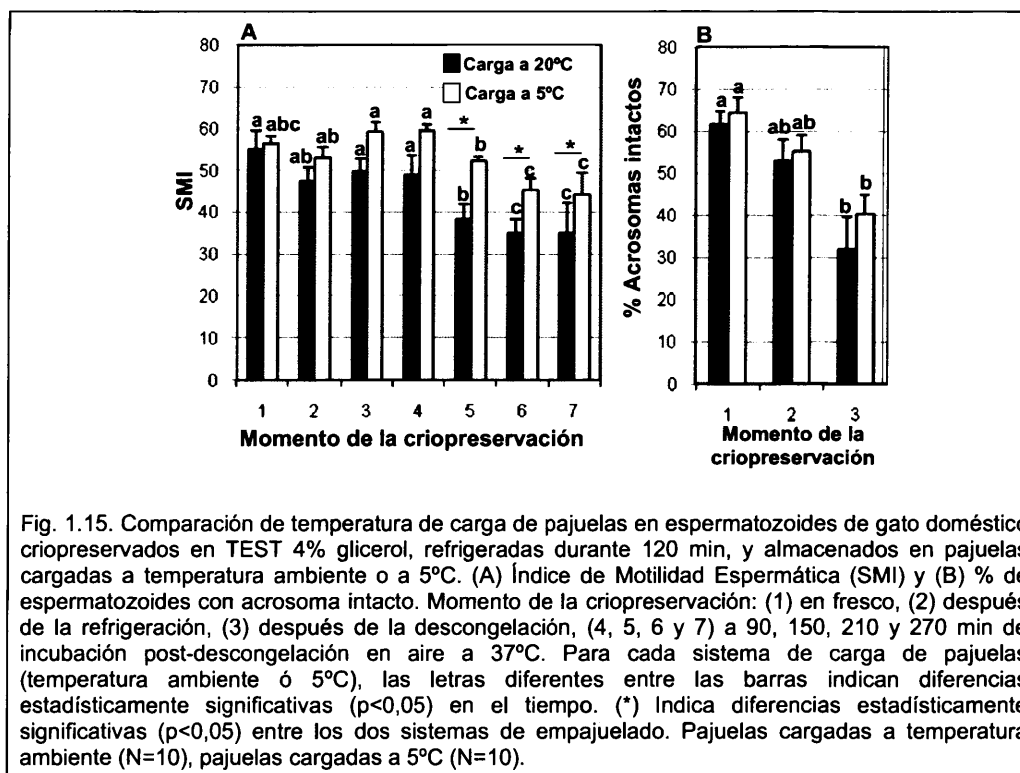
Temperatura de carga de la pajuela: ambiente o a 5°C

Se examinó la carga de las pajuelas a temperatura ambiente, antes de la refrigeración, o a 5°C dentro de una cámara fría, después de la refrigeración. En el primer caso las pajuelas se cargaron después de la evaluación de motilidad y la toma de muestras para evaluación de concentración, morfoanomalías e integridad acrosómica de la muestra fresca. Se reservó una alícuota en un microtubo para las evaluaciones post-refrigeración. Una vez cargadas y selladas las pajuelas se introdujeron en un criovial y se pasaron al recipiente donde se refrigeran junto con el microtubo con la alícuota para las evaluaciones al término de la refrigeración. En segundo lugar, la suspensión espermática se refrigeró dentro de un microtubo y, una vez finalizada la refrigeración, se cargaron las pajuelas en una cámara fría a 5°C y se tomaron muestras correspondientes para la evaluación de motilidad e

integridad acrosómica post-refrigeración. Para realizar este ensayo se utilizaron muestras extraídas en TEST con 4% glicerol, refrigeradas durante 120 min (0,125 °C/min) (Fig. 1.15).

No se encontró un descenso significativo en SMI a la descongelación en ninguno de los dos métodos comparados (Fig. 1.15A). Sí se encontraron descensos significativos en el % de espermatozoides con acrosoma intacto, tanto cuando las pajuelas se cargaron a temperatura ambiente como cuando se cargaron a 5°C, entre la muestra fresca (61,6±6,3% y 64,4±3,1%, respectivamente) y descongelada (31,8±5,9% y 40,3±7,8%, respectivamente) (Fig. 1.15B). Se observó un descenso significativo en SMI en relación a la muestra en fresco (SMI: 55,0±4,4) a partir de las 2,5 h de incubación post-descongelación (SMI: 38,2±3,8) cuando las pajuelas se cargaron a temperatura ambiente aunque no se observó mayor descenso a las 3,5 h (35,0±3,4) o a las 4,5 h (35,0±7,2) de incubación (Fig. 1.15A).

No se encontraron diferencias significativas en SMI entre el empajuelado a temperatura ambiente (antes de la refrigeración) y a 5°C (después de la refrigeración), ni finalizada la refrigeración (47,3±3,4 y 53,0±2,0, respectivamente), ni después de la descongelación (49,6±3,0 y 59,2±4,2, respectivamente) (Fig. 1.15A). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el % de espermatozoides con acrosoma intacto finalizada la refrigeración (52,7±7,1% y 55,1±5,3%, respectivamente) o a la descongelación (31,8±6,0% y 40,3±7,8%, respectivamente) (Fig. 1.15B).



Congelación: en 1 ó 2 niveles sobre vapores de nitrógeno

Se evaluaron las diferencias en motilidad y % de espermatozoides con acrosoma intacto en muestras espermáticas congeladas sobre vapores de nitrógeno, en 1 nivel (5 cm) durante 10 min o en 2 niveles (7,5 y 2,5 cm) durante 1 min en cada nivel, antes de sumergirlas en nitrógeno líquido. Para ello se utilizaron muestras extraídas en TEST con 4% glicerol añadido en 3 etapas, refrigeradas durante 120 min (0,125 °C/min) y almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C.

En las muestras congeladas en un nivel aparecen diferencias significativas en SMI a la descongelación ($32,2 \pm 3,4$) con respecto a la muestra fresca ($54,1 \pm 6,3$) que se mantienen durante la incubación post-descongelación a las 2,5 h ($28,1 \pm 3,6$) y 3,5 h ($23,2 \pm 3,2$). En las muestras congeladas en dos niveles las diferencias significativas en SMI en relación a la muestra en fresco ($57,7 \pm 2,5$) no aparecen hasta las 2,5 h post-descongelación ($41,4 \pm 3,5$) y se hacen más marcadas a las 3,5 h de incubación ($36,4 \pm 3,3$) (Fig. 1.15A). Independientemente de que se hubieran congelado las pajuelas en 1 ó 2 niveles, se han encontrado diferencias significativas en el % de espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación ($22,9 \pm 3,2$ y $33,3 \pm 6,2\%$, respectivamente) con respecto a la muestra en fresco ($55,6 \pm 7,9$ y $60,5 \pm 5,3\%$, respectivamente) y a las muestras después de la refrigeración ($49,6 \pm 7,7$ y $59,8 \pm 5,0\%$, respectivamente) (Fig. 1.15B).

El sistema de congelación produjo diferencias significativas en SMI a la descongelación a favor de las muestras congeladas en 2 niveles en relación a aquellas congeladas en 1 nivel ($47,5 \pm 3,4$ y $32,2 \pm 3,4$, respectivamente), que se mantienen durante la incubación post-descongelación ($36,4 \pm 3,3$ y $23,2 \pm 3,2$, respectivamente, a las 3,5 h de incubación) (Fig. 1.15A). No se encontraron diferencias significativas en el % espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación entre las muestras congeladas en 1 ó 2 niveles ($22,9 \pm 3,2\%$ y $33,3 \pm 6,2\%$, respectivamente) (Fig. 1.15B).

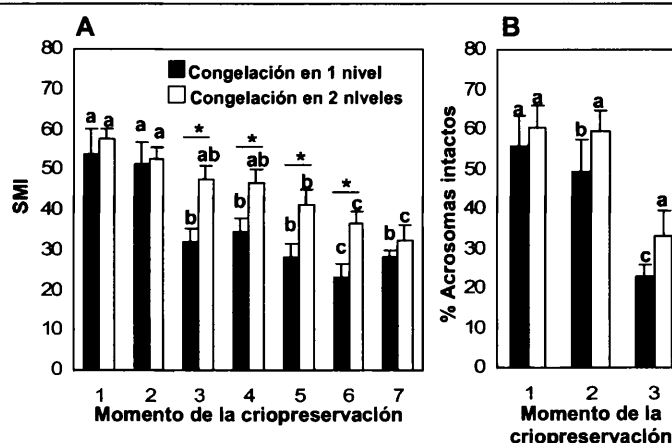


Fig. 1.16. Comparación de la congelación en 1 ó 2 niveles en vapores de nitrógeno de espermatozoides de gato doméstico criopreservados en TEST 4% glicerol, refrigeradas durante 120 min, y almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C. (A) Índice de Motilidad Espermática (SMI) y (B) % de espermatozoides con acrosoma intacto. Momento de la criopreservación: (1) en fresco, (2) después de la refrigeración, (3) después de la descongelación, (4, 5, 6 y 7) a 90, 150, 210 y 270 min de incubación post-descongelación en aire a 37°C. Para cada método de congelación (1 nivel ó 2 niveles), las letras diferentes entre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el tiempo. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los dos métodos de congelación (1 ó 2 niveles) (N=15).

Efecto de las interacciones entre factores del proceso de criopreservación

Se han estudiado las posibles interacciones (dos a dos) entre algunos de los factores analizados individualmente en los apartados anteriores. Por un lado se examinaron las posibles interacciones entre tasa de refrigeración (-0,5 ó -0,125°C/min) y tipo de diluyente (TEST o Biladyl), sistema de envasado (pajuelas o píldoras) y temperatura de carga de las pajuelas (temperatura ambiente ó 5°C). No ha resultado significativa ninguna de las interacciones en las que está implicada la tasa de refrigeración (Tabla 1.6).

Por otra parte se analizaron las posibles interacciones entre el tipo de diluyente (TEST o Biladyl) y el método de adición de glicerol (de 1 vez o en 3 etapas), el sistema de envasado (píldoras o pajuelas), la temperatura de carga de pajuelas (temperatura ambiente ó 5°C) y el sistema de congelación (en 1 ó 2 niveles). Han resultado significativas las interacciones entre el criodiluyente y la temperatura de carga de las pajuelas sobre el SMI (interacción (3-5) Tabla 1.6A) y la integridad acrosómica (interacción (3 - 5) Tabla 1.6B). En todos los análisis anteriores se ha incluido el tiempo como factor de medidas repetidas y se ha analizado su efecto y la interacción con los distintos factores intersujeto estudiados. Se ha encontrado efecto significativo de la interacción entre el tiempo y el sistema de añadido de glicerol sobre la motilidad y la integridad acrosómica (interacción (1-6) Tabla 1.6A, B) y de la interacción entre el tiempo y el sistema de envasado (pajuelas y píldoras) sobre la integridad acrosómica (interacción (1 - 4). Tabla 1.6A, B).

Tabla 1.6. Interacciones entre factores de la criopreservación y tiempo de procesado sobre el SMI y el % de espermatozoides con acrosoma intacto.

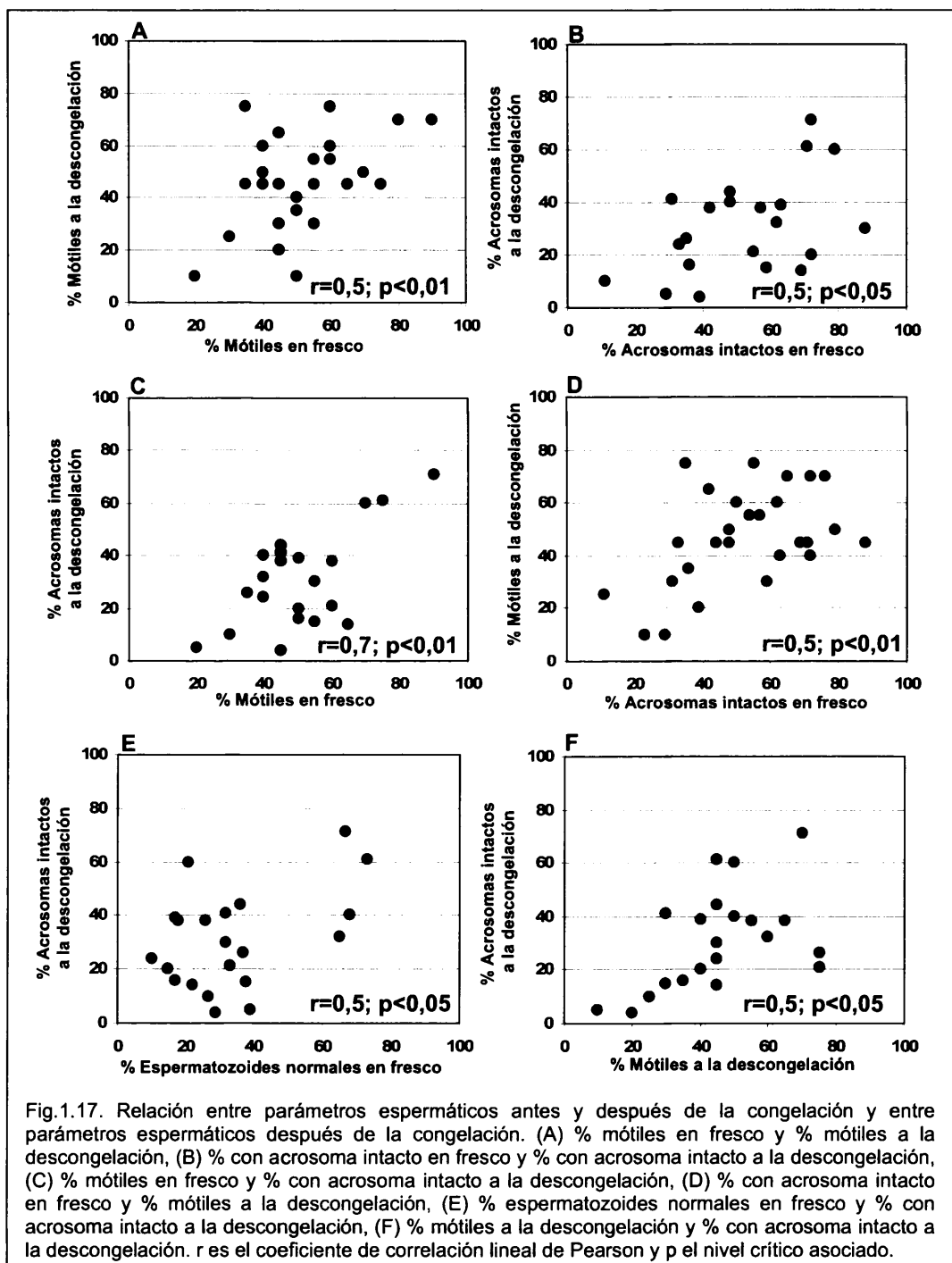
				Interacción doble		Interacción triple	
(A) SMI				F	p	F	p
1. TIEMPO	2. REFRIGERACIÓN	3. DILUYENTE		(1-2) 2,79	0,05	(1,2,3) 0,67	0,65
				(1-3) 0,94	0,48		
				(2-3) 0,54	0,47		
		4. ENVASE		(1-2) 0,44	0,81	(1,2,4) 2,58	0,07
				(1-4) 1,24	0,34		
				(2-4) 0,09	0,77		
		5. EMPAJUELADO		(1-2) 1,83	0,15	(1,2,5) 0,57	0,72
				(1-5) 0,67	0,65		
				(2-5) 1,81	0,19		
	3. DILUYENTE	4. ENVASE		(1-3) 1,9	0,16	(1,3,4) 0,6	0,70
				(1-4) 2,0	0,10		
				(3-4) 0,1	0,70		
		5. EMPAJUELADO		(1-3) 0,6	0,70	(1,3,5)2,0	0,10
				(1-5) 1,6	0,20		
				(3-5) 4,3	0,05 (*)		
		6. GLICEROL		(1-3) 1,34	0,31	(1,3,6) 2,6	0,06
				(1-6) 3,7	0,02 (*)		
				(3-6) 2,9	0,10		
	7. CONGELACIÓN		(1-3) 2,6	0,07	(1,3,6) 0,4	0,80	
		(1-7) 1,2	0,30				
		(3-7) 0,00	0,90				
(B) % acrosoma intactos				F	p	F	P
1. TIEMPO	2. REFRIGERACIÓN	3. DILUYENTE		(1-2) 0,47	0,63	(1,2,3) 0,03	0,97
				(1-3) 1,72	0,20		
				(2-3) 0,5	0,23		
		4. ENVASE		(1-2) 0,70	0,51	(1,2,4) 0,18	0,84
				(1-4) 0,43	0,06		
				(2-4) 0,26	0,62		
		5. EMPAJUELADO		(1-2) 0,32	0,63	(1,2,5) 0,49	0,62
				(1-5) 0,53	0,60		
				(2-5) 0,02	0,88		
	3. DILUYENTE	4. ENVASE		(1-3) 1,5	0,30	(1,3,4) 0,01	0,99
				(1-4) 6,0	0,01 (*)		
				(3-4) 0,15	0,70		
		5. EMPAJUELADO		(1-3) 1,5	0,20	(1,3,5) 0,01	0,99
				(1-5) 0,01	0,99		
				(3-5) 9,4	0,01 (*)		
		6. GLICEROL		(1-3) 0,6	0,60	(1,3,6) 0,7	0,50
				(1-6) 3,9	0,03 (*)		
				(3-6) 2,4	0,10		
	7. CONGELACIÓN		(1-3) 1,4	0,30	(1,3,6) 0,5	0,60	
		(1-7) 1,4	0,30				
		(3-7) 0,3	0,60				

Los números entre paréntesis indican los factores implicados en la interacción de la que se proporciona el estadístico F y el nivel crítico p del split-plot ANOVA. (*) Indica interacciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Relación entre parámetros espermáticos antes y después de la congelación

Para analizar la existencia de relaciones entre parámetros espermáticos en fresco y después de la congelación (Fig. 1.17) y entre diferentes parámetros espermáticos después de la congelación (Fig. 1.17D), se han utilizado las muestras extraídas en diluyente (TEST o Biladyl) con 4% de glicerol inicial, almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C y congeladas en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno.

Se ha encontrado relación significativa entre el % de espermatozoides móviles en fresco y post-descongelación (Fig 1.17A) y entre el % de espermatozoides con acrosoma intacto en fresco y post-descongelación (Fig. 1.17B). También se encontró relación significativa entre el % de espermatozoides móviles en fresco y el % de acrosomas intactos post-descongelación (Fig. 1.17C). Asimismo, la relación inversa, entre el % acrosomas intactos en muestras frescas y el % espermatozoides móviles post-descongelación, también fue significativa (Fig. 1.17D). Además el % de espermatozoides normales en fresco y el % con acrosomas intacto post-congelar aparecieron significativamente relacionados (Fig. 1.17E). Por último, se encontró relación significativa entre los porcentajes de espermatozoides móviles y con acrosoma intacto después de la descongelación (Fig. 1.17F).



Preparación de los espermatozoides para la fecundación in vitro

1. Efecto de dilución o centrifugación y swim-up

Se han analizado el SMI y el % de espermatozoides con acrosoma intacto después de la congelación y durante una incubación de 2 h post-descongelación, en muestras diluidas y en otras centrifugadas y dejadas reposar 30 min para permitir el swim-up de los espermatozoides. No se han encontrado descensos significativos a lo largo del tiempo de descongelación-incubación, ni en SMI, ni en el % de espermatozoides con acrosoma intacto, tanto en las muestras diluidas, como en las procesadas mediante centrifugación y swim-up. Sí se han encontrado diferencias significativas en SMI entre los dos tratamientos comparados, a favor del swim-up. Estas diferencias ocurren después de descongelar (SMI $83,8 \pm 3,81$ y $57,9 \pm 2,5$ para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente) y transcurridas 1 h ($78,0 \pm 4,6$ y $51,1 \pm 2,1$ para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente) y 2 h ($69,4 \pm 4,7$ y $43,8 \pm 4,6$, para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente) post-descongelación.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos comparados en el % de espermatozoides con acrosoma intacto. Las medias encontradas no alcanzaron diferencias significativamente ni después de la descongelación ($59,8 \pm 7,0\%$ y $47,9 \pm 3,5\%$, para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente), ni transcurridas 1 h ($51,3 \pm 13,4\%$ y $35,3 \pm 2,0\%$ para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente) ó 2 h ($32,7 \pm 8,7\%$ y $30,3 \pm 3,3\%$ para dilución y centrifugación-swim-up, respectivamente) de incubación post-descongelación.

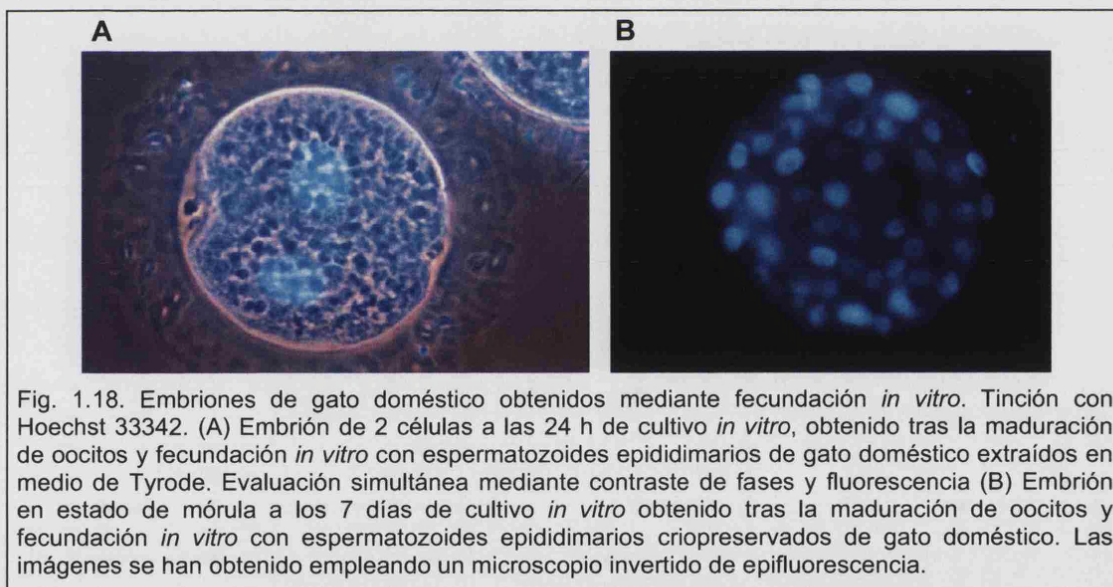
2. Efecto del añadido de 1 mM pentoxifilina

Se ha estudiado el efecto, sobre el SMI y el % de espermatozoides con acrosoma intacto, del añadido de 1 mM de pentoxifilina en medio de Tyrode, medio utilizado para descongelar e incubar los espermatozoides. No se han encontrado descensos significativos en el tiempo, ni en SMI, ni en el % de espermatozoides con acrosoma intacto, entre las muestras inmediatamente después de la descongelación y transcurrida 1 h de incubación post-descongelación, con independencia de que se hubiese añadido o no pentoxifilina al medio de descongelación. No se han detectado diferencias significativas entre los dos tratamientos (con y sin añadido de pentoxifilina al medio de descongelación), ni después de descongelar, ni transcurrida 1 h de incubación. El SMI observado fue muy similar, tanto en el momento de la descongelación ($57,5 \pm 3,7$ vs $50,7 \pm 4,0$, añadiendo y sin añadir pentoxifilina, respectivamente), como 1 h después ($48,9 \pm 1,8$ vs $46,4 \pm 4,9$, añadiendo y sin añadir pentoxifilina, respectivamente). Tampoco se detectaron grandes diferencias entre los dos tratamientos en el % espermatozoides con acrosoma intacto, ni en el momento de la descongelación ($40,4 \pm 6,8\%$ vs $39,4 \pm 8,1\%$, añadiendo y sin añadir pentoxifilina,

respectivamente), ni transcurrida 1 h de incubación ($31,3 \pm 7,5\%$ vs $29,9 \pm 7,0\%$, respectivamente, añadiendo y sin añadir pentoxifilina, respectivamente).

Fecundación in vitro de oocitos madurados in vitro con espermatozoides epididimarios criopreservados de gato doméstico

Con el fin de analizar las tasas de fecundación *in vitro* de espermatozoides epididimarios de gato doméstico criopreservados, se descongelaron muestras que habían sido procesadas mediante refrigeración durante 120 min, almacenadas en pajuelas cargadas a 5°C y congeladas en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno líquido. Las muestras control (espermatozoides no criopreservados) se extrajeron en medio de Tyrode tamponado con Hepes. Se observó que los oocitos se fecundaron *in vitro* (Fig. 1.18A) y los embriones obtenidos desarrollaron *in vitro* (Fig. 1.18B).



Los espermatozoides de gato congelados en TEST 4% fecundaron una proporción de oocitos madurados *in vitro* ($33,3 \pm 8,5\%$) que no fue significativamente diferente de la tasa de fecundación de los espermatozoides frescos, no criopreservados ($49,0 \pm 8,6\%$) (Fig. 1.19). Tampoco hubo diferencias entre las tasas de fecundación obtenidas con espermatozoides congelados en TEST 4% y aquellos congelados en TEST 0+8% glicerol, con añadido de glicerol en 3 etapas ($26,2 \pm 14,5\%$) (Fig. 1.19).

Por otra parte, se encontró una tasa de fecundación significativamente menor para los espermatozoides criopreservados en Biladyl con 4% glicerol añadido en una etapa ($9,5 \pm 4,7\%$) en comparación con los espermatozoides frescos ($49,0 \pm 8,6\%$) (Fig. 1.19), aunque las diferencias entre los espermatozoides congelados en Biladyl y los

criopreservados en TEST 4% o TEST 0+8% glicerol no fueron estadísticamente significativas.

No se encontró correlación entre la tasa de fecundación y el % de espermatozoides móviles, el % espermatozoides con acrosoma intacto o el % espermatozoides normales en fresco o después de descongelar.

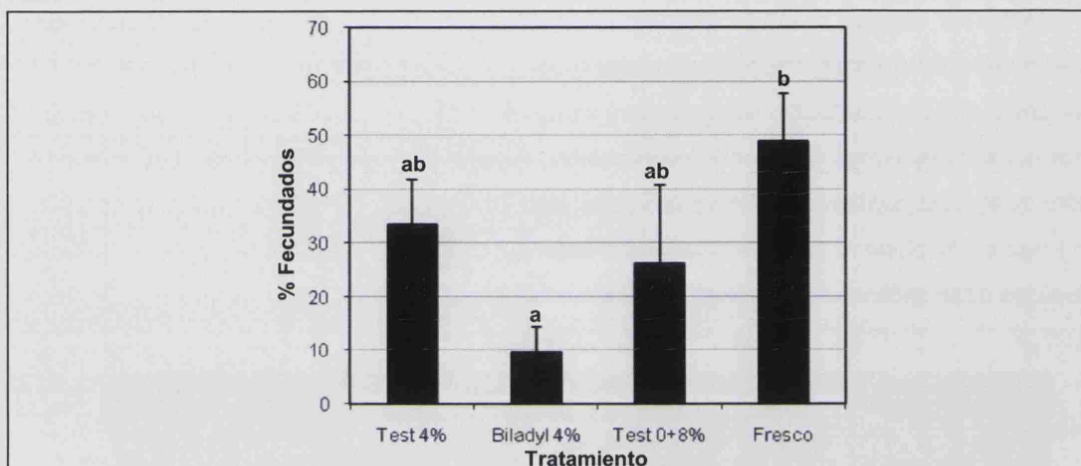


Fig. 1.19. Tasas de fecundación de oocitos de gata doméstica madurados *in vitro* con espermatozoides epididimarios de gato doméstico criopreservados en dos diluyentes (TEST y Biladyl) con glicerol añadido de una vez o por fases y grupo control de espermatozoides frescos extraídos en Tyrode tamponado con Hepes. Las letras diferentes entre barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se encontró una relación lineal significativa entre la tasa de fecundación de los oocitos y de división de los embriones ($R=0,9$; $R^2=0,8$; $p < 0,01$).

Los tratamientos de preparación de espermatozoides que se han evaluado no difirieron significativamente en la tasa de fecundación. Con espermatozoides sometidos a centrifugación-swim-up se obtuvieron $37,8 \pm 10,4\%$ de oocitos fecundados, muy similar al $36,0 \pm 8,4\%$ obtenido con espermatozoides diluidos.

En otra serie de experimentos, los espermatozoides descongelados y diluidos sin añadido de pentoxifilina resultaron en un $20,5 \pm 8,1\%$ ($0,0\% - 57,1\%$) de oocitos fecundados, muy similar a la tasa de $20,7 \pm 11,4\%$ ($0,0\% - 83,3\%$) de fecundación obtenida con espermatozoides diluidos en medio suplementado con 1 mM de pentoxifilina.

Discusión

Los resultados de este estudio han permitido realizar una caracterización de los parámetros espermáticos de gatos domésticos de la ciudad de Madrid, examinando diferencias interanuales y estacionales en la calidad de dichos parámetros. Se ha realizado además un estudio de factores que pueden afectar al éxito de la criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico, y se ha evaluado la capacidad

fecundante de los espermatozoides criopreservados mediante fecundación *in vitro* de oocitos de gata doméstica madurados *in vitro*.

Características de los espermatozoides epididimarios

El número total de espermatozoides epididimarios varió mucho entre distintos machos ($0,5 - 302,4 \times 10^6$ espermatozoides totales), al igual que se ha visto en muestras de semen eyaculado (Pineda y Dooley 1984). En general, el rango observado en número de espermatozoides epididimarios presentó el mismo rango de variación que los espermatozoides eyaculados (Pineda y Dooley 1984, Howard *et al.* 1990), aunque un estudio ha encontrado muestras eyaculadas con un número de espermatozoides un orden de magnitud mayor ($1297,4 \pm 252,3 \times 10^6$ espermatozoides totales) que el encontrado en el presente trabajo (Neubauer *et al.* 2004).

La proporción de espermatozoides móviles ($55,56 \pm 1,21\%$) fue, en general, menor que la que se registró en otros estudios, tanto con espermatozoides epididimarios (Hay y Goodrowe 1993, Goodrowe y Hay 1993, Lengwinat y Blottner 1994, Stachecki *et al.* 1994, Neubauer *et al.* 2004, Siemieniuch y Woclawek-Potocka 2008), como eyaculados (Wildt *et al.* 1983, Howard *et al.* 1990, Hermansson y Axnér 2007). El porcentaje de espermatozoides normales ($30,95 \pm 1,98\%$) reveló que, en términos generales, la mayoría de las muestras fue teratospérmica (el 74% de las muestras presentó más de un 40% de espermatozoides anormales). Tal como se ha encontrado en todos los estudios realizados con anterioridad, tanto en animales normo como teratospérmicos la anomalía más frecuente es la aparición del flagelo doblado, a nivel de la pieza media o a nivel de la pieza principal + terminal (Wildt *et al.* 1983, Howard *et al.* 1990, Stachecki *et al.* 1994, Axnér *et al.* 2004, Tebet *et al.* 2006) lo que podría ser consecuencia, en parte, de la manipulación de los espermatozoides después de la extracción (posiblemente por choque osmótico). El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto también fue similar al encontrado en varios estudios previos, y fue sólo ligeramente menor o mayor dependiendo del estudio con espermatozoides epididimarios con que se compare (Hermansson y Axnér 2007, Filliers *et al.* 2008, Thuwanut *et al.* 2008). Los valores encontrados resultaron más bajos que los obtenidos para espermatozoides eyaculados (Filliers *et al.* 2008).

Se encontraron diferencias significativas entre grupos de edad para los niveles de testosterona en el suero sanguíneo. Estas diferencias no se correspondieron totalmente con diferencias en los parámetros espermáticos, lo que apoya los resultados encontrados en otros estudios en los que no se encontró relación entre la proporción de espermatozoides normales y la edad (Axnér y Forsberg 2007).

Los resultados de este estudio no mostraron evidencia clara de la existencia de estacionalidad reproductiva en los machos de gato doméstico. Si bien se encontraron

diferencias en algunos parámetros espermáticos algunos años, el patrón no se repitió en otros. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otro estudio con espermatozoides epididimarios de gato doméstico que concluye que los espermatozoides epididimarios no difieren a lo largo del año ni en cantidad, ni en motilidad, morfología o funcionalidad (Spindler y Wildt 1999). Sin embargo, los resultados de este estudio difieren de los presentados por Blottner *et al.* (2006) que indican la existencia de un marcado efecto de la estacionalidad en los parámetros funcionales de los espermatozoides. Una posible explicación a esta discrepancia podría estar relacionada con diferencias geográficas entre los lugares donde se han realizado los estudios. Existen diferencias en latitud entre los sitios, encontrándose dos de ellos, los coincidentes en la ausencia de estacionalidad (Spindler y Wildt 1999, este estudio), en latitudes templadas, alrededor de los 40°N (40° 23'N, Madrid y 39° 28' N, Washington, DC, USA) y el tercero, donde se ha visto un marcado efecto estacional (Blottner *et al.* 2006) que se encuentra a mayor latitud, por encima de los 50°N (52°28' N, Berlín, Alemania). En consecuencia, este último sitio posee un fotoperiodo más corto en invierno y más fluctuante a lo largo del año, es decir, con más diferencias en las horas de luz entre invierno y primavera-verano.

Las diferencias interanuales encontradas en nuestro estudio son difíciles de explicar dada la procedencia de las muestras, en su mayor parte animales domésticos que viven en casas particulares en condiciones de temperatura, iluminación, alimentación, relaciones con conespecíficos del mismo o distinto sexo o estrés, sobre los que no se tenía control. Aunque muchas especies de felinos salvajes son estacionales, en el gato es probable que este carácter de la reproducción se haya modificado como consecuencia de la domesticación (Setchell 1992) o incluso que se muestren estacionales o no dependiendo de las condiciones particulares que le rodeen en cada momento.

Se examinó la posible correlación entre parámetros espermáticos. En particular se examinó la posible relación entre número total de espermatozoides y la proporción de espermatozoides anormales. Se ha propuesto (Neubauer *et al.* 2006) que en gatos teratospérmicos existe un aumento del número de espermatozoides ya que en estos machos existirían más células germinales maduras por una disminución de la apoptosis durante la espermatogénesis (Jewgenow *et al.* 2009). Nuestros resultados no han encontrado evidencia de esta relación: no se encontró una relación significativa entre número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales en gatos teratospérmicos.

Factores que afectan a la criopreservación de espermatozoides

La comparación de diluyentes de congelación (TEST y Biladyl) no mostró diferencias significativas, ni en el índice de motilidad espermática (SMI) ni en el % de espermatozoides con acrosoma intacto, entre las muestras en fresco o después de la descongelación, que

podiesen atribuirse al efecto del diluyente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que han usado diluyentes compuestos por glucosa y ácido cítrico, fructosa y ácido cítrico o lactosa, con espermatozoides extraídos de epidídimos frescos y refrigerados de gato doméstico (Hay y Goodrowe 1993). Se observó un mayor y más brusco descenso del SMI post-descongelación en las muestras congeladas en Biladyl que en las conservadas en TEST (las diferencias significativas en el tiempo ocurren 1 hora antes en Biladyl); esto sugiere que el TEST es mejor para los espermatozoides epididimarios congelados-descongelados de gato doméstico ya que permite mantener mejor motilidad durante más tiempo que el Biladyl. Dada la composición de los diluyentes comparados, es posible sugerir que la glucosa presente en el TEST favorezca a los espermatozoides más que la fructosa y el ácido cítrico que componen el Biladyl. Otros estudios han examinado el efecto del diluyente de congelación en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico, comparando TEST comercial con un criodiluyente a base de lactosa-EDTA y han observado significativamente mayores porcentajes de espermatozoides móviles, viables y normales a la descongelación con el diluyente que contiene lactosa (Minter *et al.* 2007). La misma conclusión sugieren los resultados obtenidos con espermatozoides eyaculados de tigre (Byers *et al.* 1989, Donoghue *et al.* 1992b).

El análisis del efecto de la tasa de refrigeración sobre la motilidad y la integridad acrosómica de espermatozoides epididimarios de gato doméstico criopreservados, indica que la velocidad de refrigeración de los espermatozoides parecía afectar más a la integridad acrosómica que a la motilidad. Se observó que la diferencia en los valores de SMI cuando se emplearon dos tasas de refrigeración (-0,5 y -0,125°C/min), más favorables con la refrigeración más lenta, se mantuvo constante durante la criopreservación, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. Por otra parte, el análisis de integridad de los acrosomas mostró que, después de descongelar, la muestra refrigerada durante 120 min (refrigeración lenta) presentó un mayor (aunque no significativo) % de espermatozoides con acrosoma intacto que la sometida a refrigeración rápida durante 30 min. Estos resultados apoyan los obtenidos en estudios anteriores (Pukazhenthí *et al.* 1999) sobre la mayor resiliencia de la motilidad y la mayor sensibilidad de la integridad acrosómica frente al daño por choque térmico (Villaverde *et al.* 2006). En el trabajo mencionado (Pukazhenthí *et al.* 1999) se observó que una refrigeración ultrarrápida de 14°C/min y rápida de 4°C/min dieron lugar a diferencias significativas, al retomar la temperatura inicial, con respecto a la muestra en fresco, que no se dieron con una tasa de refrigeración más lenta, de -0,5°C/min (Pukazhenthí *et al.* 1999). Estos resultados confirman por tanto que las tasas de refrigeración más rápidas resultan más dañinas que las más lentas, particularmente entre los 20°C y los 0°C, que es cuando se producen los cambios de fase más profundos en los lípidos que forman la membrana espermática (Watson 1981). Otros estudios con

espermatozoides epididimarios de gato doméstico (Hermansson y Axnér 2007) no han observado diferencias significativas en el % de acrosomas intactos al recuperar la temperatura ambiental cuando se compararon tasas de refrigeración más o menos rápidas, seguramente debido a que la diferencia entre las tasas comparadas (3°C/min vs 4°C/min) fue muy pequeña, como reconocen los propios autores. Estudios más recientes con felinos salvajes también han encontrado que la motilidad se ha visto afectada ligeramente por el empleo de tasas de refrigeración más o menos rápidas (0,7°C/min y 0,16°C/min) y que la integridad acrosómica sí se ha visto afectada significativamente (ocelote: Baudi *et al.* 2008). Lo sorprendente fue que en el ocelote los mejores resultados en cuanto a integridad acrosómica a la descongelación se obtuvieron utilizando una tasa de refrigeración más rápida (0,7°C/min) en lugar de otra más lenta (0,16°C/min), al contrario de lo visto para el gato doméstico. En el caso de la tigrina (*Leopardus tigrinus*), aunque la reducción en la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto no fue significativamente menor a la descongelación que en la muestra en fresco, la tendencia sí fue la misma que para el gato doméstico, con mayor proporción de espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación cuando se empleó una tasa de refrigeración más lenta (Baudi *et al.* 2008). A partir de todos estos resultados puede concluirse que, aunque la tendencia general es que tasas de refrigeración más rápidas resultan más dañinas que las más lentas, tal como describió Watson (1981) y se ha confirmado en estudio realizados con gato doméstico, puede observarse el comportamiento contrario, al menos para velocidades entre 0,16°C/min y 0,7°C/min, en los espermatozoides de algunas especies como el ocelote.

Se evaluó el efecto de adición del glicerol antes o después de la refrigeración, siendo la adición en el primer caso de una vez, mientras que en el segundo caso el glicerol se añadió en tres etapas (de 1/4, 1/4 y 1/2 de la cantidad final), con intervalos de 15 min entre cada una. Los resultados obtenidos no concuerdan con lo esperado ya que se ha postulado que el añadido del crioprotector, en este caso el glicerol, en forma gradual minimiza la pérdida de motilidad y la disrupción de membranas (Pukazhenthil *et al.* 2002). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio indican que la motilidad espermática (SMI) a la descongelación fue mayor, aunque no significativamente, con el añadido del glicerol de una vez (antes de la refrigeración), que con el añadido en 3 etapas (al finalizar la refrigeración). Nuestros resultados no concuerdan tampoco con los resultados obtenidos para el gato pescador, para el cual resultó significativamente mejor, tanto para la motilidad como para la integridad acrosómica a la descongelación, el añadido de glicerol a 5°C al finalizar la refrigeración, que a 25°C (Thiangtum *et al.* 2006). Los efectos diferenciales del añadido de glicerol antes o después de la refrigeración se mantuvieron durante la incubación de los espermatozoides después de la descongelación. Así, los espermatozoides a los que se añadió el glicerol en una etapa, antes de la refrigeración, mostraron una motilidad

significativamente mejor (mayor SMI) en diferentes momentos de la incubación post-descongelación, tanto a 1,5 h, 2,5 h y 3,5 h, en relación a la motilidad observada en espermatozoides a los que el glicerol se añadió al finalizar la refrigeración, justo antes de la congelación. Las discrepancias entre los resultados obtenidos en éste y en otros estudios quizás puedan deberse a que se han empleado espermatozoides epididimarios y eyaculados, respectivamente. Aunque ambos presentan motilidad y % de acrosomas intactos similares en fresco, y en ambos ocurre un descenso de estos parámetros a la descongelación, no se han estudiado en detalle los requisitos de criopreservación de espermatozoides epididimarios. Podría ser que, el no estar en contacto con los factores estabilizadores de membrana supuestamente presentes en el plasma seminal, los espermatozoides epididimarios sean más sensibles a la criopreservación que los espermatozoides eyaculados, particularmente en cuanto a la integridad acrosómica (Luvoni 2006) o, en términos generales, les haga comportarse de forma diferente a los eyaculados ante la congelación-descongelación. De todos modos, hay estudios que no han encontrado diferencias significativas en criosensibilidad entre espermatozoides epididimarios y eyaculados (Tebet *et al.* 2006, Hermansson y Axnér 2007).

También se examinó el efecto del añadido del glicerol antes y después de la refrigeración sobre la integridad acrosómica. Los mejores resultados en % de espermatozoides con acrosoma intacto post-refrigeración, obtenidos para las muestras a las que se les ha añadido el glicerol gradualmente al terminar la refrigeración ($59,8 \pm 3,4\%$ acrosomas intactos) en comparación a las que se les añadió el glicerol de una vez, antes de la refrigeración ($55,1 \pm 5,3\%$ acrosomas intactos), podría deberse a un efecto tóxico del crioprotector, que no se hace notar en aquellas pero sí en éstas. A la descongelación, sin embargo, este efecto parece desaparecer y se compensaría con el del resto de factores que intervienen en el proceso de congelación haciendo que, en promedio, sean ligeramente mejores las muestras a las que se les añadió en glicerol al inicio del proceso de criopreservación, que las muestras a las que se les añadió al término de la refrigeración ($40,3 \pm 7,8\%$ y $33,3 \pm 3,5\%$ acrosomas intactos, respectivamente).

Se ha comprobado en estudios anteriores que la congelación en pajuelas de plástico resulta mejor que la congelación en píldoras sobre hielo seco para espermatozoides eyaculados de gato doméstico criopreservados en TEST (Pope *et al.* 1991a). Con los resultados de nuestro estudio es posible concluir que también para los espermatozoides epididimarios de gato doméstico resulta mejor la congelación en pajuelas que en píldoras. Los resultados obtenidos difieren de los encontrados en otros felinos, como el tigre, para el que parecen resultar mejor las píldoras combinadas con un diluyente de congelación con lactosa, que las pajuelas combinadas con TEST (Donoghue *et al.* 1992b). También difieren de los resultados encontrados para el jaguar y el guepardo (Swanson *et al.* 1996c) cuando

se usa un diluyente basado en lactosa y para el ocelote (Stoops *et al.* 2007) cuando se usó un diluyente en base a TEST, en los cuales ambos métodos (píldoras y pajuelas) proporcionan resultados similares post-descongelación. Estudios recientes han encontrado que resulta mejor para espermatozoides epididimarios de gato doméstico el almacenamiento en crioviales (1 ml) que en pajuelas (0,5 ml) cuando se utiliza un diluyente de congelación en base a lactosa y EDTA (Minter *et al.* 2007).

Cuando se comparó la temperatura de carga de las pajuelas, realizada a temperatura ambiente, antes de la refrigeración, o a 5°C, finalizada ésta, se encontraron valores menores (aunque no significativos) de SMI y % de espermatozoides con acrosomas intacto a la descongelación en las muestras cargadas en las pajuelas a temperatura ambiente. En la incubación post-descongelación (desde 1,5 h hasta 4,5 h de incubación) se encontraron valores significativamente menores de SMI en las muestras cargadas a temperatura ambiente (antes de la refrigeración). Estos resultados pueden deberse a que cuando las pajuelas se cargan antes de la refrigeración el volumen de suspensión espermática que se somete a la bajada de temperatura (50 µl/pajuela) es menor que cuando se cargan las pajuelas al finalizar la refrigeración, ya que se refrigera la muestra completa (~300 µl) en un microtubo hasta alcanzar los 5°C. Por ello el descenso de temperatura muy posiblemente sea más rápido en las primeras que en las segundas y los espermatozoides experimentan un estrés térmico más agudo. Pese a estos resultados hay que señalar que en condiciones de campo no es generalmente posible el rellenado de las pajuelas a 5°C, ya que las neveras disponibles no presentan condiciones adecuadas para manipular el semen o, en ocasiones no se dispone de nevera. Por estos motivos será necesario anticipar y asumir el ligero descenso de calidad de las muestras de semen que se congelen empleando la carga de pajuelas a temperatura ambiente.

Se examinó el efecto del método de congelación de pajuelas en vapores de nitrógeno, en 1 nivel, a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido, durante 5 min, o en 2 niveles, a 7,5 cm y 2,5 cm de la superficie del nitrógeno líquido, 1 min en cada uno. La congelación empleando el sistema de 2 niveles resultó significativamente mejor para la motilidad y la integridad acrosómica que la congelación en 1 nivel, tal como se observó en el momento de la descongelación como en la incubación posterior. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otro trabajo con espermatozoides eyaculados de gato doméstico según los cuales las tasas de congelación más lentas (de 3,85-43°C/min entre 5°C y -40°C) resultaron en mayores porcentajes de espermatozoides móviles y con el acrosoma intacto a la descongelación que las tasas más rápidas (Zambelli *et al.* 2002).

El análisis de las interacciones entre factores que pueden afectar al proceso de criopreservación sugiere que el añadido de glicerol en una o varias etapas tiene o no efecto significativo sobre la motilidad y la integridad acrosómica de los espermatozoides después

de descongelar según el diluyente que se emplee. No existen estudios detallados sobre espermatozoides de gato doméstico evaluando la interacción de factores que inciden sobre el éxito de la congelación.

Se examinó la posible relación entre parámetros espermáticos antes y después de la criopreservación. Se encontró una correlación positiva y significativa entre la proporción de espermatozoides móviles en fresco y a la descongelación, y también entre la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto, en fresco y después de la congelación. Estos resultados sugieren que los valores de motilidad e integridad acrosómica de los espermatozoides epididimarios de gato pueden ser buenos predictores de la supervivencia espermática a la criopreservación. También se encontró una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides móviles en fresco y la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación. La relación inversa también fue positiva y significativa: se observó una buena correlación entre el porcentaje de acrosomas intactos en fresco con el porcentaje de espermatozoides móviles a la descongelación. Estas correlaciones significativas pueden en parte deberse al hecho de que, en las muestras de espermatozoides epididimarios en fresco, existe una relación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides móviles y el % espermatozoides con acrosoma intacto. La relación entre motilidad e integridad de acrosomas también se observó en las muestras descongeladas. Por otra parte, se identificó una correlación significativa entre el porcentaje de espermatozoides normales en fresco y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto a la descongelación. Las correlaciones entre morfología espermática y la integridad acrosómica en muestras frescas y descongeladas, y entre integridad acrosómica y motilidad son indicadoras de la relación existente entre la morfología espermática y la criosensibilidad. Estos resultados confirman por tanto que la proporción de espermatozoides morfológicamente normales y con acrosoma intacto son importantes indicadores de la supervivencia de los espermatozoides a la criopreservación (Pukazhenthil *et al.* 2007). Además apoyan los resultados obtenidos en otros trabajos según los cuales el porcentaje de espermatozoides normales y con el acrosoma intacto están positivamente relacionados (Fukuda *et al.* 1989, Crosier *et al.* 2006), pero difieren de los obtenidos en otros trabajos realizados con espermatozoides epididimarios de gato doméstico, que no encontraron correlación significativa entre el % de espermatozoides normales en fresco y % de acrosomas intactos después de descongelar (Axnér *et al.* 2004).

Fecundación in vitro con espermatozoides criopreservados

El empleo del método de swim-up ha resultado muy bueno para incrementar la motilidad de espermatozoides epididimarios de gato doméstico criopreservados, pues permitió obtener unos valores de índice de motilidad espermática (SMI) a la descongelación

significativamente mayores que los observados después de una simple dilución de las muestras descongeladas. Sin embargo, el swim-up presenta el inconveniente de reducir sustancialmente la concentración de espermatozoides en la suspensión, que puede ser crítico en algunas especies de felinos dado el reducido número total de espermatozoides (Howard *et al.* 1993, Swanson *et al.* 2006) que puede recogerse en cada muestra y que, en ocasiones, condiciona tener que realizar, por ejemplo, una fecundación *in vitro* con concentraciones espermática por debajo de lo deseado. De todos modos, el incremento en la proporción de espermatozoides móviles no resultó en tasas de fecundación mayores.

El resultado encontrado después del tratamiento de los espermatozoides criopreservados con 1 mM de pentoxifilina mostró valores de SMI similares en las muestras descongeladas a las que les añadió el estimulante en el medio de descongelación que en aquéllas a las que no se les añadió. Este resultado puede ser debido a la concentración de pentoxifilina empleada, ya que el efecto de éste y otros estimulantes es dosis-dependiente (Stachecki *et al.* 1994). Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos en un trabajo anterior, también con espermatozoides epididimarios de gato doméstico criopreservados, en el que incluso con concentraciones que eran 2 órdenes de magnitud inferiores a 1 mM, tal como se ha utilizado en nuestro estudio, obtuvieron diferencias significativas de motilidad con respecto a la muestra control a la que no se añadió el estimulante (Stachecki *et al.* 1994). Se seleccionó esta concentración (1 mM) para nuestros ensayos sobre la base de resultados obtenidos en pruebas preliminares en las que se encontró que los espermatozoides no sobrevivieron a concentraciones de 20 mM de pentoxifilina. Los resultados de integridad acrosómica obtenidos en este estudio representan los primeros análisis de evaluación de este parámetro espermático en espermatozoides de gato doméstico tratados con pentoxifilina y serán de utilidad para evaluar los efectos de inhibidores de fosfodiesterasa sobre la capacitación y reacción acrosómica (Luvoni 2006). De todos modos, será necesario realizar más estudios para examinar los efectos de una combinación de análogos de cAMP e inhibidores de fosfodiesterasa para maximizar el efecto de estimulación de la motilidad.

Pese a que la criopreservación de espermatozoides ocasiona alteraciones de la motilidad, la morfología y la integridad estructural de los espermatozoides a la descongelación y en consecuencia, también del potencial fecundante de los mismos (Luvoni *et al.* 2003b), sólo con uno de los tratamientos de criopreservación examinados (Biladyl con 4% de glicerol añadido en 1 etapa) se encontró una reducción significativa en la tasa de fecundación *in vitro* en relación a la obtenida con espermatozoides frescos. Puede decirse por tanto que el TEST es un buen diluyente de congelación para espermatozoides epididimarios de gato doméstico y que cuando se utiliza este diluyente, el añadido de glicerol

en 1 ó 3 etapas no afecta significativamente a la tasa de fecundación *in vitro* con este tipo de espermatozoides.

No se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de oocitos fecundados y la motilidad, el % espermatozoides con acrosoma intacto o el % espermatozoides normales en fresco o después de descongelar. Estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos en otro trabajo con espermatozoides eyaculados y criopreservados de gato doméstico, donde se encontró una correlación significativa entre el SMI a la descongelación y la tasa de penetración de oocitos de gata doméstica madurados *in vitro* (Zambelli *et al.* 2006). Un motivo que podría explicar esta discrepancia podría estar relacionado con el hecho de que en nuestro estudio los oocitos se evaluaron en el momento de la primera división (a las 44 - 48 h post-inseminación), en lugar de medir directamente la tasa de oocitos penetrados.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran que alrededor de 3/4 partes de la población de gatos domésticos de Madrid es teratospérmica (con una proporción de espermatozoides normales <40%). Indican además la existencia de diferencias interanuales pero no estacionales en los parámetros espermáticos característicos del gato doméstico, por lo que no puede hablarse de estacionalidad reproductiva en los machos de esta población. Tampoco muestran un incremento de la producción espermática en gatos teratospérmicos.

No se han encontrado diferencias significativas a la descongelación en la motilidad y el % de espermatozoides con el acrosoma intacto en suspensiones espermáticas epididimarias criopreservadas atribuibles al diluyente de congelación (TEST o Biladyl), la tasa de refrigeración (-0,5 ó -0,125°C/min), el añadido de glicerol en 1 ó 3 etapas ni la carga de las pajuelas antes o después de la refrigeración. Sí se ha encontrado diferencias significativas en el SMI a la descongelación relacionadas con el sistema de envasado de los espermatozoides y con la congelación sobre vapores de nitrógeno, resultando mejor las pajuelas que las píldoras y el sistema en 2 niveles (con una tasa de congelación más lenta), que en 1 solo nivel. Se ha podido confirmar la importancia de la proporción de espermatozoides normales y con acrosoma intacto como indicadores de la supervivencia a la descongelación, y también se observó una buena relación entre proporción de espermatozoides móviles antes y después de la congelación.

El swim-up proporcionó valores de SMI a la descongelación significativamente mayores que los encontrados en muestras descongeladas y diluidas, pero el swim-up no condujo a tasas de fecundación *in vitro* significativamente mayores que las encontradas con dilución de espermatozoides. La suplementación con 1 mM de pentoxifilina al medio de descongelación no ha producido un incremento significativo de la motilidad de los espermatozoides a la descongelación y tampoco ha generado tasas de fecundación significativamente mayores que el logrado por muestras espermáticas no estimuladas.

La criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico en TEST con 4% de glicerol añadido en una etapa, empleando una tasa de refrigeración lenta (0,125°C/min), almacenando la suspensión espermática en pajuelas y congelando en dos niveles sobre vapores de nitrógeno permitió obtener tasas de fecundación *in vitro* que no difirieron significativamente de las obtenidas con espermatozoides en fresco. Por otra parte, la criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico en Biladyl con 4% de glicerol añadido en una etapa, siguiendo una tasa de refrigeración lenta (0,125°C/min), almacenando la suspensión espermática en pajuelas y congelando en dos niveles sobre vapores de nitrógeno resultó en tasas de fecundación *in vitro* significativamente más bajas que las obtenidas con espermatozoides en fresco, por lo que se descarta este diluyente para la criopreservación de espermatozoides de gato. El TEST, por lo tanto, ha demostrado ser un buen diluyente de congelación para espermatozoides epididimarios de gato doméstico.

Capítulo 2

**Efecto del almacenamiento de epidídimos
de gato domestico (*Felis catus*)
a 5°C sobre la calidad y la
criopreservación espermáticas**



Resumen

La recuperación de gametos *post mortem* a partir de los epidídimos puede constituir una poderosa herramienta para la conservación de material genético muy valioso. El gato doméstico es un buen modelo para felinos salvajes y por ello hemos explorado en esta especie el efecto del tiempo de almacenamiento de epidídimos después de la muerte del animal sobre la motilidad espermática y la integridad acrosómica, ambos después de la recuperación de los gametos y tras su congelación y descongelación. También hemos examinado el efecto del tiempo de equilibrado de los espermatozoides con el glicerol antes de la congelación. La motilidad varió significativamente entre las muestras procedentes de epidídimos almacenados durante 0 h, 48 h ó 72 h; se observaron diferencias significativas después de la recuperación de espermatozoides (SMI $55,91 \pm 2,02$, $48,21 \pm 1,47$ y $43,03 \pm 1,32$, respectivamente; $p < 0,05$) y después de la descongelación ($51,81 \pm 3,02$, $41,90 \pm 2,14$ y $42,35 \pm 1,95\%$, respectivamente; $p < 0,05$). El porcentaje de acrosomas intactos no varió significativamente con el tiempo de almacenamiento (promedio $60,33 \pm 1,38\%$ después de la recuperación y $52,50 \pm 1,91\%$ post-descongelación). El porcentaje de espermatozoides normales recuperados después de diferentes tiempos de almacenamiento no difirió (promedio $19,22 \pm 1,25\%$ de espermatozoides normales después de la recuperación). Cuando los epidídimos se almacenaron durante 72 h, el tiempo de equilibrado de los espermatozoides con el glicerol causó diferencias significativas después de la descongelación en motilidad (SMI $39,17 \pm 2,76$ y $45,00 \pm 2,65$ para 30 y 120 min de equilibrado, respectivamente; $p < 0,05$) y en integridad acrosómica ($45,76 \pm 4,91\%$ y $60,67 \pm 3,64\%$ para 30 y 120 min de equilibrado, respectivamente; $p < 0,05$). Concluimos que los mejores resultados se alcanzan cuando los espermatozoides se recuperan de los epidídimos tan pronto como es posible después de la muerte del animal y se dejan después equilibrar con el glicerol durante 120 min. Estos resultados tendrán importante aplicación en el rescate de espermatozoides epididimarios de felinos amenazados, como el lince ibérico.

Introducción

Hay 37 especies de felinos en el mundo y todas, a excepción del gato doméstico (*Felis catus*), están amenazadas o en peligro (IUCN 2008). La investigación sobre la reproducción de felinos no domésticos es necesaria para desarrollar programas de gestión y conservación genética más eficaces (Swanson 2003). Sin embargo, estas investigaciones son muchas veces difíciles de desarrollar en especies amenazadas por la existencia de sólo unos pocos individuos en cautividad. Por tanto, la investigación de la reproducción de felinos puede beneficiarse del uso de especies modelo (Wildt *et al.* 1986b, Pukazhenthii *et al.* 2006a). El gato doméstico se ha usado frecuentemente como modelos para felinos salvajes dado que la mejora del conocimiento sobre la biología y tecnología reproductiva en ésta y otras especies modelo puede beneficiar la conservación de sus parientes salvajes (Pope 2000).

El germoplasma criopreservado (espermatozoides, oocitos y embriones) puede ser almacenado casi indefinidamente en bancos de recursos genéticos (GRBs) como una reserva de la diversidad genética de las especies (Roldan y Gomendio 2009). La recogida y preservación de espermatozoides maduros, en combinación con técnicas de reproducción asistida (ARTs) como la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides podría un papel crítico en el mantenimiento de la biodiversidad animal. El empleo de espermatozoide maduros criopreservados ha sido el centro de las ARTs para estudiar y gestionar pequeñas poblaciones de especies salvajes (Pukazhenthii *et al.* 2007). Las ARTs tienen un tremendo potencial en programas de conservación de poblaciones de felinos en peligro (Swanson 2006). La criopreservación de espermatozoides es por lo tanto imprescindible para realizar una adecuada preservación de la diversidad genética en especies de felinos (Luvoni 2006) y su uso posterior en ARTs para permitir el flujo genético en o entre poblaciones de vida libre o cautivas sin requerir la presencia real y/o la actividad copuladora del macho (Pukazhenthii *et al.* 2006a, Swanson *et al.* 2007).

Los espermatozoides maduros pueden recuperarse después de eyaculación por electroestimulación, o a partir de los epidídimos y/o conductos deferentes *post mortem* (Jewgenow *et al.* 1997, Silva *et al.* 2004, Roldan y Gomendio 2009). No parecen existir grandes diferencias entre espermatozoides eyaculados y epididimarios con respecto a la motilidad, la integridad de membrana plasmática, la morfología espermática o la integridad acrosómica examinadas antes o después de la criopreservación (Luvoni 2006, Tebet *et al.* 2006, Hermansson y Axné 2007). El tiempo de capacitación para espermatozoides epididimarios y eyaculados tampoco parece diferir (Goodrowe *et al.* 1988). Ambos tipos, epididimarios y eyaculados, congelados-descongelados son capaces de fecundar *in vitro*

(Bowen 1977, Niwa *et al.* 1985, Hay y Goodrowe 1993, Lengwinat y Blottner 1994) o mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Bogliolo *et al.* 2001).

Para asegurar el almacenamiento de muestras de espermatozoides epididimarios de buena calidad, la recogida y el procesado deberían ser, idealmente, llevados a cabo inmediatamente después de la muerte del animal. Las células espermáticas pueden sobrevivir durante algún tiempo en los epidídimos de animales muertos, pero se producirá el deterioro de la calidad espermática siguiendo a los cambios relacionados con la descomposición del cuerpo (Songsasen *et al.* 1998) y esto se incrementará a medida que aumente el tiempo transcurrido *post mortem*. En especies salvajes la muerte puede ocurrir como resultado de accidentes (ej. atropellados por un coche) o enfermedades, y por tanto será impredecible y, además, ocurrirá lejos del laboratorio. El almacenamiento en refrigeración (5°C) puede prolongar la supervivencia de los espermatozoides en los epidídimos, reduciendo el daño y proporcionando más tiempo para la recuperación y el procesado de las muestras espermáticas. La recuperación *post mortem* de espermatozoides puede representar una opción reproductiva para machos que no se han reproducido todavía o la posibilidad de una última recuperación de espermatozoides para preservar unos valiosos recursos genéticos que de otra forma se perderían para siempre (Goodrowe *et al.* 2000).

Se han recogido espermatozoides de los epidídimos de varias especies (ej. Kikuchi *et al.* 1998, Kishikawa *et al.* 1999, Yu y Leibo 2002) incluyendo al gato doméstico (ej. Hay y Goodrowe 1993, Lengwinat y Blottner 1994, Tittarelli *et al.* 2006). Hasta ahora los estudios han examinado la calidad espermática transcurridos varios días de almacenamiento de los epidídimos a 5°C. Los resultados han mostrado que en estos casos que hay un descenso de la motilidad espermática (Tittarelli *et al.* 2006). Pocos estudios han examinado la integridad acrosómica (factor esencial para asegurar la capacidad fecundante de los espermatozoides) tras varios días de almacenamiento (Tittarelli *et al.* 2006, Axné *et al.* 2004). Además muy pocos estudios han evaluado la capacidad de los espermatozoides de soportar la criopreservación después del almacenamiento de los epidídimos por varios días a 5°C (Hay y Goodrowe 1993).

La criopreservación causa un descenso significativo de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Watson 2000). Además la congelación y descongelación puede provocar el daño del acrosoma en una proporción muy alta de espermatozoides (Swanson y Wildt 1997), que comprometa la capacidad fecundante de los mismos. La proporción de espermatozoides normales e intactos es un importante predictor de la supervivencia espermática a la criopreservación (Pukazhenthi *et al.* 2007). Por otra parte, se ha demostrado que los espermatozoides de diferentes especies varían en su sensibilidad a la congelación (ej., diferencias en su resistencia al choque térmico) (Loskutoff *et al.* 1996,

Leibo y Bradley 1999, Leibo y Songsasen 2002) y, en consecuencia, es necesario ajustar los protocolos de criopreservación a las diferentes especies. Un factor que puede afectar a la supervivencia a la congelación es el tiempo de exposición de los espermatozoides al agente crioprotector (usualmente glicerol), dado que largos tiempos de exposición pueden ser perjudiciales (Nelson *et al.* 1999, Luvoni *et al.* 2003b). Es por tanto necesario valorar si los espermatozoides almacenados en los epidídimos durante diferentes periodos varían en el tiempo necesario de equilibrado con el glicerol.

Los objetivos de este estudio fueron, utilizando espermatozoides epididimarios de gato doméstico como modelo, analizar (a) el efecto del tiempo de almacenamiento de los epidídimos *post mortem* sobre la calidad espermática y la supervivencia después de la criopreservación (b) el efecto de diferentes tiempos de exposición al crioprotector (glicerol) antes de la congelación (tiempo de equilibrado) sobre la calidad espermática después de la descongelación (c) el efecto de ambos, tiempo de almacenamiento y de equilibrado en la longevidad espermática post-descongelación.

Material y métodos

Animales

Las muestras empleadas en la realización de este trabajo se obtuvieron, durante todo el año, después de las castraciones realizadas en clínicas veterinarias y sociedades protectoras de animales de Madrid. Los testículos y los epidídimos se colocaron en una bolsa de plástico con autocierre y la bolsa dentro de un contenedor de porexpán en el que se transportó a temperatura ambiente hasta el laboratorio, entre 2 - 12h después de la cirugía (ver capítulo 1).

Recogida de espermatozoides epididimarios

Las muestras se asignaron aleatoriamente a uno de los 8 grupos experimentales: cuatro tiempos de almacenamiento (0 (control), 24, 48 y 72 h a 4-5 °C) y dos tiempos de equilibrado con el glicerol (30 ó 120 min). Los epidídimos control se manipularon a temperatura ambiente mientras que todas las demás se almacenaron en una cámara fría (5°C) durante diferentes tiempos. Los epidídimos se diseccionaron y cortaron transversalmente con una hoja de bisturí, y las colas epididimarias (la porción distal) se colocaron en 0,4 ml de un criodiluyente (ver más abajo) en una placa de Petri (35 x 10 mm, Falcon 351008, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Francia) durante 10 min. El criodiluyente se enfrió previamente a 5°C, excepto para las muestras control con las que se utilizó en diluyente de congelación a temperatura ambiente. Como criodiluyente se utilizó uno basado en buffer Tris, compuesto por 2,42% Tris, 1% fructosa, 1,38% ácido cítrico, 20% yema de huevo y 4% de glicerol (Biladyl, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). El diluyente de

congelación se suplementó con una mezcla de antibióticos (tilosina-gentamicina-espectinomicina-lincomicina; Minitüb catálogo 13500/0005). El Biladyl se suministra en dos soluciones, A con 0% de glicerol, y B con 14% de glicerol, que se mezclaron para obtener una concentración final de 4% glicerol.

Evaluación de espermatozoides

En primer lugar se evaluó el volumen de suspensión espermática (con una micropipeta) y se transfirió a un microtubo estéril (1,5 ml). Después se colocó una alícuota entre porta y cubreobjetos precalentados a 37°C y se examinó el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de la motilidad (escala de 0 a 5; Howard *et al.* 1986) utilizando óptica de contraste de fases. Los valores de motilidad se utilizaron para calcular el Índice de Motilidad Espermática (SMI):

$$SMI = \frac{\%móviles + (calidad \times 20)}{2}$$

Una alícuota (5 µl) de la suspensión espermática se fijó con una solución de glutaraldehído al 1% en tampón 0,165 M de cacodilato (pH 7,3) para estimar la concentración espermática utilizando una cámara de Neubauer. Otra alícuota (10 µl) se fijó con 250 µl de una solución de paraformaldehído al 4% en una solución tampón 110 mM de Na₂HPO₄ y 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4) (ver capítulo 1) que se almacenaron a 5°C hasta ser procesados para preparar frotis que se tiñeron después con azul de Coomassie (Larson y Miller 1999) para valorar la morfología espermática y la integridad acrosómica.

Para valorar la morfología un total de 100 espermatozoides se evaluaron bajo óptica de campo claro y se clasificaron como normales, o con anomalías de cabeza, pieza media o resto del flagelo (ver capítulo 1). La integridad acrosómica se valoró contando otros 100 espermatozoides de cada muestra; los acrosomas se clasificaron como intactos, dañados o perdidos (Pukazhenthil *et al.* 2006b).

Criopreservación de espermatozoides

Una vez transcurrido el tiempo de maceración de los epidídimos se eliminaron los restos de epidídimos y los espermatozoides se mantuvieron en el criodiluyente, en contacto con el agente crioprotector (glicerol), durante 30 o 120 min para que se equilibren, antes de la congelación. Una vez transcurrido el tiempo de equilibrado se cargaron 50 µl de suspensión espermática en pajuelas cortadas (ver capítulo 1) a temperatura ambiente (muestras control) o a 5°C en una cámara fría, según se tratase de las muestras control o almacenadas, respectivamente. Antes de la carga, se cortaron las pajuelas (ver capítulo 1). Después de rellenarlas a temperatura ambiente, las muestras control se llevaron a 5°C en 30 ó 120 min. En una serie de experimentos diferentes, los espermatozoides se recogieron a

temperatura ambiente de epididimos frescos (no almacenados), que se refrigeraron en 120 min hasta alcanzar los 5°C y por último se cargaron en pajuelas dentro de una cámara fría. Después de cargarlas, las pajuelas se cerraron con un sellador térmico (ERSA, Minitüb), y se congelaron en vapores de nitrógeno utilizando un sistema de congelación en 2 pasos (Pukazhenthí *et al.* 2007; ver capítulo 1) y transferidas a un tanque de nitrógeno líquido donde se almacenaron.

Descongelación y evaluación de espermatozoides

Las pajuelas se descongelaron por exposición al aire (a temperatura ambiente) durante 10 s y a continuación se sumergieron en un baño maría con cloruro de sodio al 0,9 % (p/v); ver capítulo 1) estéril a 37°C durante 30 s. Transcurrido este tiempo el contenido de la pajuela se vertió en un microtubo estéril (1,5 ml) precalentado a 37°C. Inmediatamente después de la descongelación, la suspensión espermática se diluyó (1:3 v/v) lentamente con medio F-10 de Ham tamponado con Hepes (Irvine Scientific catalogo 99168, Izasa, Barcelona, España) al que se añadió un suplemento para el medio F-10 de Ham (Gentamicin-50X. Irvine Scientific, catálogo 1290127, Izasa), que se suministra liofilizado y proporciona una concentración final (al diluir 1:50) de 1 mM de glutamina, 1mM de piruvato y 10 µg/ml de gentamicina. Además se suplementó con suero fetal bovino inactivado (FBS) (5%), L-glutamina (0,292 mg/ml), piruvato (0,110 mg/ml) y antibióticos (130 u.i. penicilina/ml, 130 µg estreptomina/ml y 260 µg neomicina/ml). Se tomaron alícuotas para evaluar la motilidad y fijar para la posterior evaluación de la integridad acrosómica post-descongelación. El resto de la suspensión espermática se incubó a 37°C en atmósfera de aire, y se tomaron muestras para evaluación de motilidad e integridad acrosómica a 1,5, 2,5 y 3,5 h post-descongelación.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Para analizar las diferencias en motilidad e integridad acrosómica a lo largo de proceso de criopreservación que pueden deberse al efecto del tiempo de almacenamiento de los epidídimos y de equilibrado de los espermatozoides se utilizó un diseño factorial de 4 x 2 niveles. Los datos se analizaron con la versión 11.5 de SPSS. Los resultados se presentaron como media±SEM. Un valor de $p<0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las diferencias de parámetros espermáticos entre años y dentro de cada año se analizó mediante ANOVA de una vía y el test *post hoc* de Tukey. El efecto de el tiempo de almacenamiento y de equilibrado sobre el SMI y el % de acrosomas intactos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y contrastes *post hoc*. Las diferencias entre las muestras control refrigeradas (hasta 5°C) durante 120 min y cargadas en pajuelas antes o después de la refrigeración se evaluaron mediante un test de t para muestras

independientes. En todos los casos se exploraron previamente los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las relaciones entre parámetros espermáticos se analizaron mediante correlación no paramétrica de Spearman.

Resultados

Espermatozoides recogidos de epidídimos de gato doméstico almacenados

Las muestras espermáticas se recogieron de los epidídimos durante 3 años (2005-2007). La comparación de parámetros espermáticos entre años no mostró diferencias significativas. De forma parecida, tampoco se observaron diferencias de calidad a lo largo del año.

La comparación de dos grupos de muestras control, esto es, espermatozoides extraídos de los epidídimos sin almacenamiento previo de éstos y cargados en pajuelas antes o después de la refrigeración de la suspensión espermática hasta 5°C, no reveló diferencias significativas en el SMI o el % de acrosomas intactos durante el proceso de criopreservación e incubación postdescongelación. Por tanto, en el resto de experimentos las muestras se cargaron en las pajuelas a temperatura ambiente y después se refrigeraron y congelaron.

Tabla 2.1. Parámetros espermáticos del gato doméstico después del almacenamiento de los epidídimos durante diferentes tiempos a 5°C.

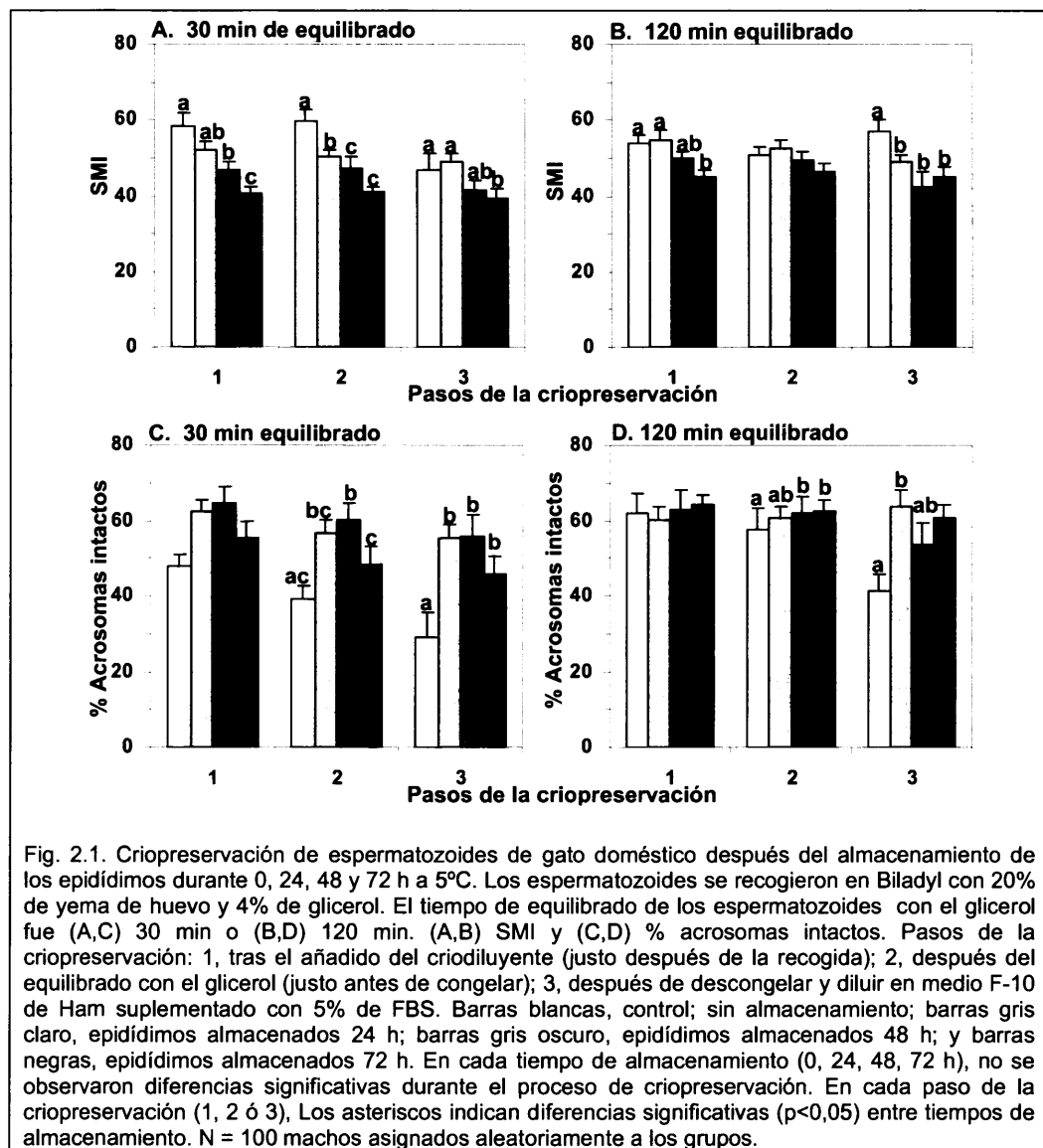
	Tiempo de almacenamiento de los epidídimos (h)			
	0	24	48	72
Número de machos	22	36	28	40
Motilidad (%)	56,83±2,47 ^a	54,17±2,10 ^a	50,54±2,11 ^a	41,50±1,57 ^b
Calidad de la motilidad (escala 0 - 5)	2,75±0,17 ^{ab}	2,61±0,08 ^b	2,29±0,07 ^a	2,19±0,07 ^{ac}
Índice de Motilidad Espermática (SMI)	55,91±2,02 ^{ab}	53,53±1,62 ^b	48,21±1,47 ^{bc}	43,03±1,32 ^c
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	17,84±2,28	18,72±2,40	19,96±2,61	20,00±2,54
Espermatozoides con acrosoma intacto (%)	55,29±3,49	60,94±2,23	63,69±3,35	60,23±2,43

Los espermatozoides se recuperaron en Biladyl con 4% de glicerol.

Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento de los epidídimos.

Se encontraron diferencias significativas ($p<0,01$) debidas al tiempo de almacenamiento de los epidídimos, en el % espermatozoides móviles, la calidad de la motilidad y, consecuentemente, en el SMI en las muestras recién extraídas (Tabla 2.1). El SMI disminuyó significativamente tras 48 h (48,21±1,47) y 72 h de almacenamiento (43,03±1,32) con respecto a las muestras control (epidídimos no almacenados) (55,91±2,02) (Tabla 2.1, Figs. 2.1A, B). En contraste, el % de espermatozoides normales y el % de

acrosomas intactos fue similar en el control y después del almacenamiento durante 24, 48 ó 72 h (Tabla 2.1, Figs. 2.1C, D).



Criopreservación espermática después del almacenamiento de los epidídimos

Hubo diferencias significativas en el SMI después de la recuperación de los espermatozoides cuando los epidídimos fueron almacenados a 5°C durante tiempos diferentes (Fig. 2.1A, B). Durante la criopreservación de suspensiones espermáticas equilibradas con el glicerol durante 30 min, se notó un ligero declive del SMI en las muestras

obtenidas a partir de epidídimos frescos, pero las diferencias entre el momento de la recogida (SMI $58,5 \pm 3,46$) y el de después de la descongelación (SMI $46,67 \pm 4,58$) no fueron significativas. Por el contrario no se observó ningún declive en el SMI durante la criopreservación de los espermatozoides procedentes de epidídimos frescos equilibrados con el glicerol durante 120 min. En los espermatozoides recogidos de epidídimos almacenados durante 24 - 72 h, no se observaron cambios en el SMI durante la criopreservación (Figs. 2.1A, B). Las diferencias iniciales en el SMI vistas entre espermatozoides recogidos de epidídimos almacenados por tiempos diferentes también estuvieron presentes después de la descongelación, para cualquiera de los dos tiempos de equilibrado con el glicerol estudiados (Figs. 2.1A, B). Con un tiempo de equilibrado de 120 min el SMI post-descongelación más alto lo encontramos en el grupo control (SMI $56,94 \pm 3,33$), significativamente mayor del registrado en las muestras almacenadas durante 24 h (SMI $48,93 \pm 1,90$), 48 h (SMI $42,5 \pm 3,69$) ó 72 h (SMI $45,00 \pm 2,65$).

No se observaron diferencias importantes en el % de espermatozoides con el acrosoma intacto después de la recuperación, independientemente del tiempo de almacenamiento de los epidídimos. Durante la criopreservación, no se observó descenso significativo en la integridad acrosómica dentro de cada grupo (tiempo de almacenamiento de epidídimos).

Cuando los espermatozoides descongelados se incubaron en medio F-10 con un 5% de FBS, se observó un declive en el SMI en todas las muestras, para todos los tiempos de almacenamiento de epidídimos o de equilibrado de espermatozoides y glicerol. Las diferencias significativas en el SMI vistas a la descongelación en los espermatozoides sometidos a diferentes tiempos de almacenamiento se mantuvieron durante la incubación posterior. Esto fue más evidente para los espermatozoides equilibrados durante 30 min (Fig. 2.2A) que para los equilibrados durante 120 min (Fig. 2.2B). Después de 3,5 h de incubación, los espermatozoides de epidídimos almacenados durante 72 h tuvieron un SMI significativamente menor cuando fueron equilibrados 30 min antes de la congelación que cuando fueron equilibrados 120 min (Figs. 2.2A, B).

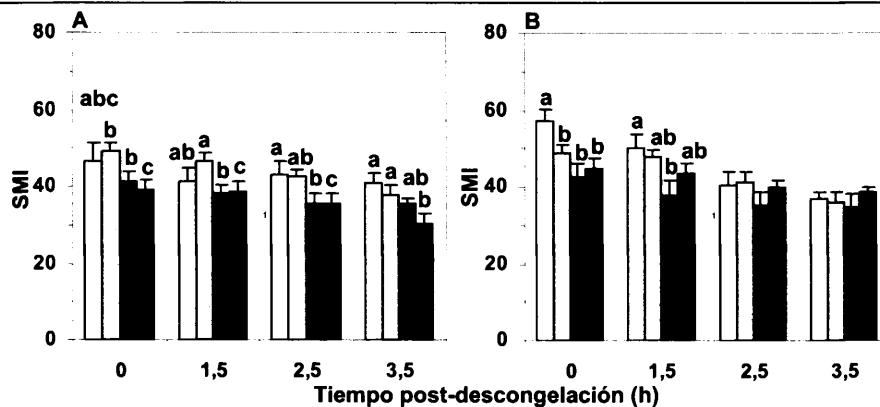
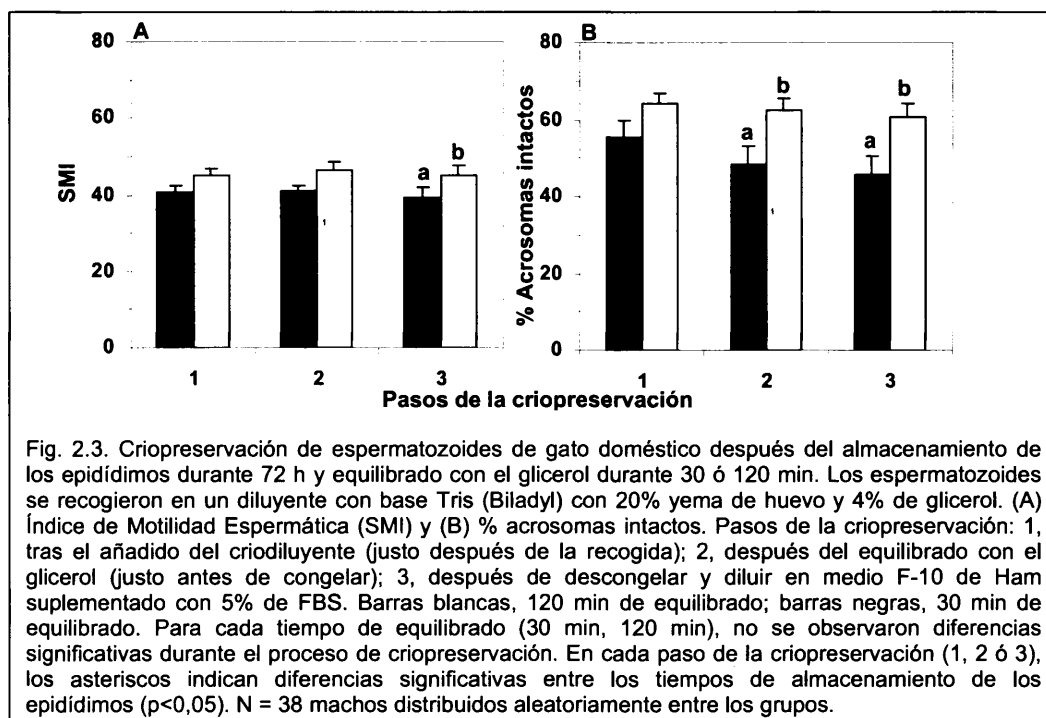


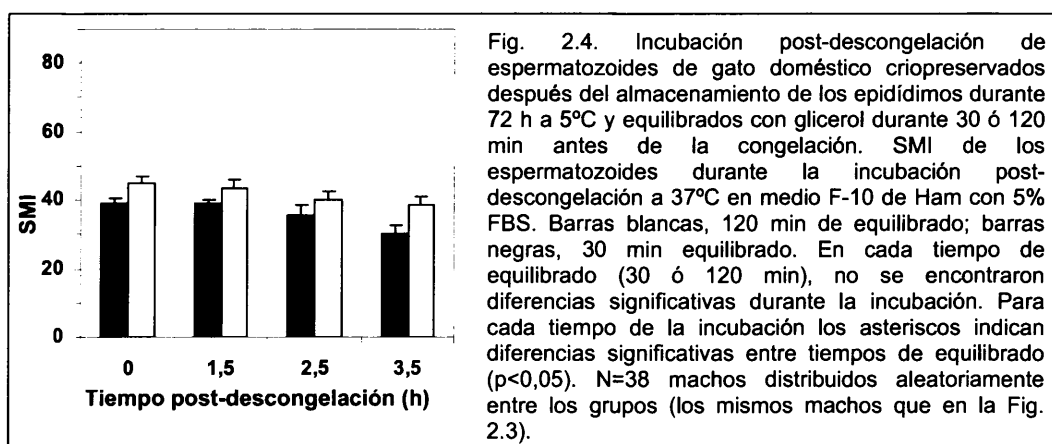
Fig. 2.2. Incubación postdescongelación de espermatozoides de gato doméstico criopreservados después del almacenamiento de los epidídimos durante 0, 24, 48 ó 72 h a 5°C. SMI de los espermatozoides durante la incubación postdescongelación a 37°C en medio F-10 de Ham con 5% FBS. Espermatozoides equilibrados con glicerol durante (A) 30 min o (B) 120 min antes de la congelación. Barras blancas, control; sin almacenamiento; barras gris claro, epidídimos almacenados 24 h; barras gris oscuro, epidídimos almacenados 48 h; y barras negras, epidídimos almacenados 72 h. En cada tiempo de almacenamiento (0, 24, 48, 72 h), no se observaron diferencias significativas durante la incubación. En cada tiempo de la incubación, los asteriscos indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos de almacenamiento de los epidídimos. N = 100 machos asignados aleatoriamente a los grupos (los mismos machos que en la Fig. 2.1).

Tiempo de equilibrado con el crioprotector

En muestras espermáticas recogidas de epidídimos almacenados durante 0, 24 ó 48 h, y equilibrados con el glicerol durante 30 ó 120 min no hubo diferencias significativas ni en SMI ni en integridad acrosómica post-descongelación. Por otra parte cuando los epidídimos se almacenaron durante 72 h antes de la recolección y criopreservación de los espermatozoides hubo diferencias entre los dos tiempos de equilibrado con el glicerol (30 vs 120 min). Transcurrido el tiempo de equilibrado (antes de la congelación), no se observaron diferencias en el SMI (Fig. 2.3A) pero se registró un % de espermatozoides con acrosoma intacto significativamente mayor cuando se dejaron los espermatozoides en contacto con el crioprotector durante 120 min (Fig. 2.3B). Después de descongelar, hubo diferencias significativas tanto en SMI (Fig. 2.3A) como en el % de acrosomas intactos (Fig. 2.3B), alcanzándose mayores valores en las muestras equilibradas durante 120 min.



La incubación postdescongelación de espermatozoides equilibrados con el glicerol durante 30 ó 120 min (procedentes de epidídimos almacenados durante 72 h antes de la recuperación de los mismos) reveló que las diferencias en el SMI vistas después de la descongelación se mantienen por encima de las 3,5 h de incubación, con valores significativamente más altos en las muestras equilibradas durante 120 min (Fig. 2.4).



No se encontró interacción significativa entre el tiempo de almacenamiento de los epidídimos y de equilibrado con el crioprotector (glicerol).

Correlación entre la morfología espermática y los daños en los espermatozoides inducidos por el almacenamiento o la criopreservación

No hubo incremento en la proporción de espermatozoides anormales o acrosomas dañados durante el proceso de almacenamiento (Tabla 2.1). No se encontró relación entre el % de espermatozoides normales, o el % de acrosomas intactos, y la motilidad (% de espermatozoides móviles o SMI) entre las muestras espermáticas recién recogidas.

Se examinaron las posibles relaciones entre los porcentajes de espermatozoides normales o con acrosoma intacto de las muestras espermáticas recién recogidas y la motilidad espermática e integridad acrosómica post-descongelación. No se encontraron diferencias significativas, analizando los grupos experimentales (almacenamiento de epidídimos durante 0, 24, 48 ó 72 h) por separado o conjuntamente. Sí se encontró correlación significativa ($p < 0,003$) entre el % de acrosomas intactos y el % de espermatozoides móviles después de la descongelación en todos los grupos experimentales.

Discusión

Este estudio ha examinado los efectos del tiempo de almacenamiento de los epidídimos antes de la recogida de los espermatozoides, y del tiempo de equilibrado con glicerol, sobre la motilidad y la integridad acrosómica después de la recuperación y después de la criopreservación espermática. Se ha usado el gato doméstico como modelo para felinos salvajes, con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la recuperación de los espermatozoides sobre la conservación de este material biológico en un banco de recursos genéticos. Los resultados mostraron que un incremento en el tiempo de almacenamiento afecta negativamente a la motilidad espermática en el momento de la recuperación y la supervivencia espermática después de la criopreservación. Además, un tiempo de equilibrado con el glicerol de 120 min proporcionó mejores resultados que una exposición al glicerol de sólo 30 min.

El almacenamiento de epidídimos durante diferentes periodos antes de la recuperación de espermatozoides viables se ha logrado en el ratón (Kishikawa *et al.* 1999), dog (Yu y Leibo 2002), y en varios animales domésticos (cerdo: Kikuchi *et al.* 1998; carnero: Kaabi *et al.* 2003; toro: Martins *et al.* 2009), y ungulados salvajes (ciervo sika: Hishinuma *et al.* 2003; ciervo rojo ibérico: Soler *et al.* 2005; búfalo: Friedmann *et al.* 2000, Kilian *et al.* 2000; eland: Kilian *et al.* 2000, Bisset *et al.* 2005). Otros estudios con gato doméstico (Tittarelli *et al.* 2006), ratón (Kishikawa *et al.* 1999), ciervo sika (Hishinuma *et al.* 2003) y ciervo rojo (Soler *et al.* 2003) han mostrado que la viabilidad espermática es más resiliente al tiempo de almacenamiento que la motilidad espermática y que la viabilidad no se ve afectada negativamente por diferentes tiempos de almacenamiento entre la muerte del

animal y la recuperación de los espermatozoides. Se han obtenido fetos normales vivos de ratón mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides con espermatozoides inmóviles recuperados 20 días después de la muerte (Kishikawa *et al.* 1999).

Hemos encontrado que la motilidad de los espermatozoides epididimarios de gato doméstico se vio afectada por el tiempo de almacenamiento de los epidídimos. Un periodo corto, de alrededor de 24 h, no causa descenso significativo de la motilidad en el momento de la recuperación, lo cual concuerda con las conclusiones obtenidas previamente con epidídimos almacenados durante una noche (Hay y Goodrowe 1993). Por otra parte, almacenamientos más largos durante 48 - 72 h reducen la motilidad significativamente, en concordancia con estudios en los cuales los epidídimos se habían almacenado durante 72 h (Tittarelli *et al.* 2006) aunque debe señalarse que en el último estudio mencionado la proporción de los espermatozoides mótiles fue mucho más baja que la vista en el presente trabajo. El efecto negativo del tiempo de almacenamiento de los epidídimos sobre la motilidad es similar al visto cuando los espermatozoides epididimarios de gato doméstico se recuperan después de la castración, se refrigeran a 5°C y se incuban durante 72 h, observándose también una reducción significativa de la motilidad (Villaverde *et al.* 2006). No obstante, parece que los espermatozoides epididimarios de gato doméstico pueden mantenerse a 4-5°C durante 14 días conservando alrededor del 50% de espermatozoides mótiles y del 85% de espermatozoides viables después de este tiempo (Harris *et al.* 2001). Pese al descenso de la motilidad debido al almacenamiento en refrigeración, algunos estudios han concluido que la refrigeración de los espermatozoides de gato doméstico a 4°C, y su uso durante 2-3 días después de la recogida, puede ser mejor que la criopreservación (Siemieniuch y Dubiel 2007) debido probablemente a la facilidad y ventajas que ofrece el procedimiento.

En epidídimos no almacenados, el % de espermatozoides con el acrosoma intacto (promedio alrededor del 60%) no fue muy diferente de los vistos en otro estudio con gato doméstico (alrededor del 67%; Axner *et al.* 2004) pero fue menor que los resultados observados por otros autores (alrededor del 80%; Tittarelli *et al.* 2006). No observamos descenso considerable de la proporción de acrosomas intactos durante un almacenamiento de hasta 72 h; en ocasiones, hubo sólo un ligero descenso. Estos resultados concuerdan con los encontrados en estudios previos, que también encontraron una alta proporción de acrosomas intactos para almacenamientos durante 24 h (Hay y Goodrowe 1993) o de hasta 72 h (Tittarelli *et al.* 2006).

Los espermatozoides recuperados de epidídimos almacenados a 5°C durante 24 h fueron capaces de sobrevivir a la criopreservación, sin diferencias observadas en SMI o integridad acrosómica después de la descongelación con respecto a los valores vistos en espermatozoides recuperados en menor tiempo. Estos resultados se dieron con

independencia de que el tiempo de equilibrado de los espermatozoides y el glicerol fueran 30 ó 120 min antes de la congelación. El descenso en el SMI a la descongelación se encontró cuando los epidídimos se almacenaron 48 ó 72 h y cuando los espermatozoides se equilibraron durante 30 ó 120 min. Por tanto, cuanto más breve sea el intervalo transcurrido hasta la extracción de los espermatozoides de los epidídimos, mayor será el SMI después de la descongelación. Las diferencias en el SMI notada a la extracción y después de la descongelación se mantuvieron durante la incubación post-descongelación. Estos resultados sugieren que para el rescate futuro de espermatozoides epididimarios de felinos salvajes, es aconsejable una rápida recuperación y criopreservación para asegurar una buena motilidad para su uso posterior en inseminación artificial o IVF.

No se produjo sustancial reducción en la integridad acrosómica a la descongelación incluso en espermatozoides recogidos de epidídimos almacenados hasta 72 h. Estos resultados son mucho mejores que los encontrados incluso para un corto periodo de almacenamiento de los epidídimos, donde se registró una alta proporción de células con daño acrosómico (Hay y Goodrowe 1993, Lengwinat y Blottner 1994).

La comparación de diferentes tiempos de equilibrado de los espermatozoides con el glicerol sobre el SMI y el % de acrosomas intactos reveló que los resultados fueron mejores con un periodo de equilibrado largo (120 min) que con uno corto (30 min). Es posible que el agente crioprotector necesite más tiempo para estabilizar las membranas espermáticas; esto concuerda con los resultados que muestran que, en espermatozoides de gato doméstico recuperados de epidídimos no almacenados, un periodo de refrigeración de 120 min (desde temperatura ambiente a 5°C) es mejor que un periodo corto (capítulo 1). Debido a que las diferencias significativas en SMI antes de la congelación y después de la descongelación fueron vistas cuando los epidídimos se almacenaron durante 72 h antes de la recuperación de los espermatozoides, parece que los espermatozoides se vuelvan más sensibles al choque osmótico que ocurre durante la criopreservación a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento de los epidídimos.

Durante la incubación después de la descongelación, la motilidad disminuyó solo ligeramente en cada grupo sugiriendo que no hay un daño importante debido a la criopreservación. En este estudio, la supervivencia postdescongelación fue mayor que la encontrada en trabajos de otros investigadores en los que se observó un considerable descenso en la motilidad y la integridad acrosómica usando otros criodiluyentes (Axnér *et al.* 2004). Las diferencias entre grupos con diferentes tiempos de almacenamiento observadas después de la extracción de los espermatozoides e inmediatamente después de la descongelación se mantuvo durante la incubación postdescongelación sugiriendo que el principal efecto se debió al tiempo de almacenamiento de los epidídimos.

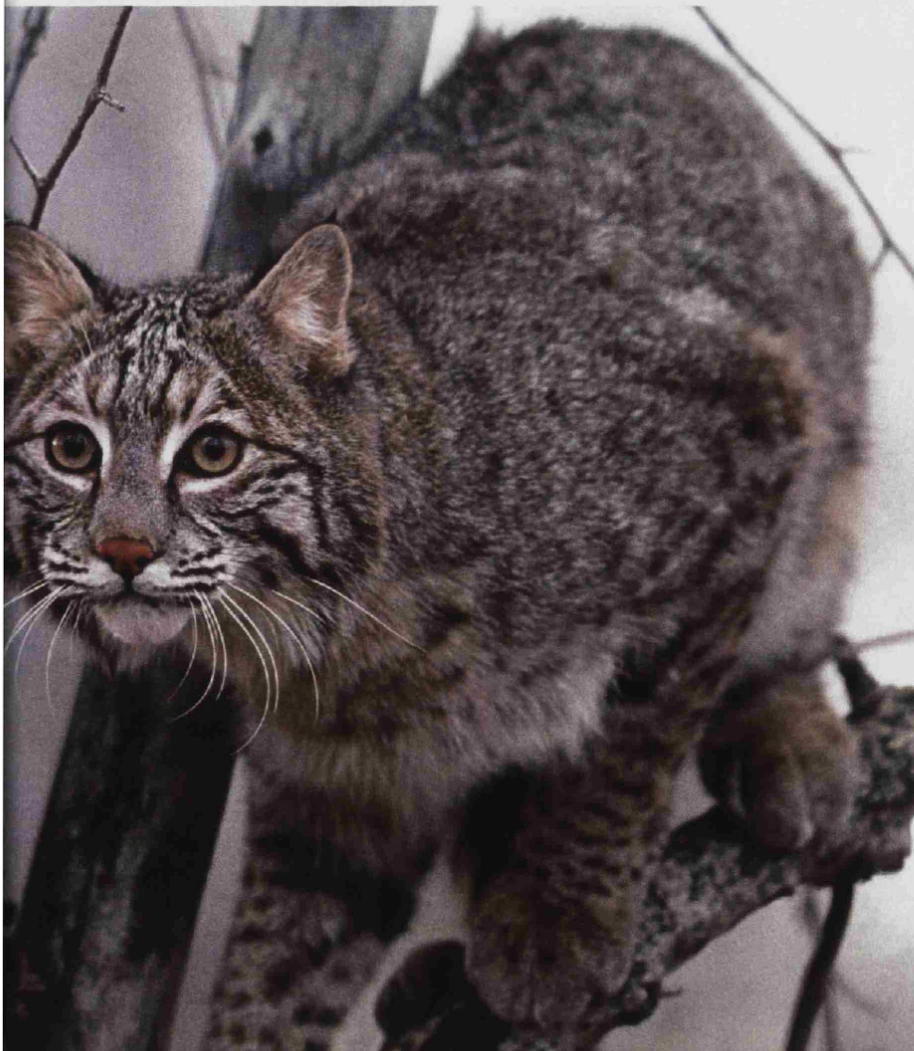
No encontramos correlaciones significativas entre la proporción de espermatozoides

normales de los espermatozoides a la extracción y la motilidad e integridad acrosómica después de descongelación. Estos resultados concuerdan con otros encontrados anteriormente con espermatozoides epididimarios de gato doméstico (Axnér *et al.* 2004) y difieren de la propuesta de que hay relación entre morfología espermática en semen fresco y la supervivencia durante la criopreservación (Pukazhenthí *et al.* 2007). Se ha sugerido que existen diferencias en espermatozoides eyaculados de gatos normozoospermicos y teratozoospermicos en cuanto a la susceptibilidad de estos al daño después de la refrigeración y después de un estrés osmótico (Pukazhenthí *et al.* 1999, Siemieniuch y Dubiel 2007). La ausencia de correlación encontrada entre la morfología espermática y el daño inducido por la criopreservación, en este y otros estudios previos usando espermatozoides epididimarios de gato doméstico puede ser debida a diferencias en las características de la membrana entre espermatozoides eyaculados y epididimarios.

En conclusión, hemos (a) criopreservado con éxito espermatozoides epididimarios de gato doméstico previamente almacenados durante varios días a 5°C, (b) mostrado que un periodo prolongado de almacenamiento disminuye la motilidad espermática en la recuperación, indicando la importancia de la rapidez del rescate en la recuperación de los epidídimos después de la muerte del animal para la criopreservación de los espermatozoides de felinos salvajes, (c) identificado que un periodo de 120 min de equilibrado de los espermatozoides con el glicerol es significativamente mejor para el mantenimiento de la motilidad y la integridad acrosómica durante la criopreservación que un periodo corto de 30 min, (d) encontrado que no hay relación significativa entre las anomalías de los espermatozoides recogidos de los epidídimos y la motilidad espermática o la integridad acrosómica después de la criopreservación, y (e) no hemos identificado interacción significativa entre el tiempo de almacenamiento de los epidídimos y el tiempo de equilibrado con el glicerol sobre la motilidad espermática o la integridad acrosómica después de la descongelación.

Capítulo 3

Características reproductivas del macho, criopreservación de semen y fecundación *in vitro* heteróloga en el lince rojo (*Lynx rufus*)



Resumen

Existe muy poca información sobre los parámetros del eyaculado, la criopreservación espermática y la capacidad fecundante del lince rojo. Se electroeyacularon varios machos de lince rojo, bajo anestesia general, en Noviembre (otoño) y Abril (primavera) y se realizó una caracterización endocrina y espermática. La testosterona (media \pm SEM, 0,90 \pm 0,15 ng/ml) no fue diferente entre los dos momentos de muestreo pero el cortisol (promedio 13,95 \pm 1,73 μ g/dl) fue significativamente mayor en Abril. El número medio de espermatozoides fue de 10 \pm 3,4 x 10⁶ espermatozoides/eyaculado, con valores significativamente mayores en Abril. La motilidad espermática (promedio 55,7 \pm 5,8% de espermatozoides móviles) no fue diferente entre los dos momentos de muestreo. La proporción de espermatozoides normales en el eyaculado (promedio 14,7 \pm 2,1%) fue significativamente mayor en Abril, pero el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (promedio 43,7 \pm 3,8%) fue significativamente mayor en otoño. Los espermatozoides se criopreservaron en un diluyente con buffer Tes-Tris (TEST) o con buffer Tris (Biladyl), ambos con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol. Los espermatozoides diluidos se cargaron en pajuelas, se refrigeraron utilizando un bloque térmico programable con una cámara seca, se congelaron en vapores de nitrógeno, se descongelaron, y se incubaron en medio F-10 de Ham con 5% de suero fetal bovino durante 3 h. Después de la criopreservación en TEST hubo alrededor de un 50% de espermatozoides móviles y la supervivencia fue alta durante la incubación post-descongelación. La criopreservación en Biladyl proporcionó resultados similares pero la motilidad descendió durante la incubación post-descongelación. Los espermatozoides de lince rojo fecundaron oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*. Las tasas de fecundación fueron más altas con los espermatozoides recogidos en Abril y criopreservados en TEST (46%) que las obtenidas usando Biladyl (<3%). Los oocitos fecundados se dividieron en cultivo y algunos (27%) alcanzaron el estado de mórula. Este estudio ha permitido obtener información básica sobre la reproducción del lince rojo, explorar las condiciones de criopreservación de sus espermatozoides y mostrar que la capacidad fecundante puede valorarse usando oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*.

Introducción

Los linces rojos (*Lynx rufus*) se encuentran principalmente en Estados Unidos, pero también se distribuyen por el norte de México y sur de Canadá (Larivière 1997). El lince rojo vive en hábitat diversos, desde los humedales costeros subtropicales en el sureste, zonas áridas en el noroeste, y bosques templados en el norte de Estados Unidos (Wedelin 1981, Nowell y Jackson 1996; Larivière 1997). En México, pueden encontrarse lince rojos en zonas de matorral y pastizal, y en bosque tropical seco (IUCN 2008). La población total de lince rojo en Estados Unidos se estimó a principios de los años 80 entre 725.000 y 1 millón de individuos. La pérdida de hábitat constituye la principal amenaza para el lince rojo aunque la especie se caza legalmente en los tres países en los que habita. En los últimos 20 años el lince rojo ha sido la especie de felino que se ha capturado y con la que se ha comerciado más intensamente (Nowell y Jackson 1996). Se ha registrado que más de 50.000 pieles se exportaron desde Estados Unidos sólo en el año 2006 (IUCN 2008).

De acuerdo con la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN 2008) el lince rojo es una especie "de bajo riesgo" y se incluye en la categoría global 5a, y regional 4 para América, del ranking de vulnerabilidad de especies establecido por el Grupo de Especialistas en Felinos de la IUCN (Nowell y Jackson 1996). También se incluye en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES).

Los linces rojos adultos son reproductivamente activos hasta que mueren (Crowe 1975). Los machos muestran reducción estacional de la actividad espermatogénica durante el verano y principios del otoño, aunque dicha reducción puede estar ausente en los machos más viejos. La estación reproductiva varía con la latitud, longitud, altitud y variaciones climáticas (Crowe 1975). La reproducción puede ocurrir durante todo el año, aunque el pico tiene lugar entre diciembre y agosto, ocurriendo la mayoría de los nacimientos entre Abril y Mayo. Las hembras que crían pronto pueden llegar a tener una segunda camada en el mismo año. Los linces rojos son poliginicos (Provost *et al.* 1973).

La información básica sobre las características reproductivas de los linces rojos es escasa. La cría en cautividad, principalmente en zoos, revela que muchos individuos son incapaces de reproducirse en estas condiciones. Sólo han nacido 3 cachorros en los últimos 12 meses en los centros registrados en el Sistema Internacional de Información sobre Especies (ISIS 2008). Junto con su inherente valor de conservación, el lince rojo representa un importante modelo para especies filogenéticamente próximas como el críticamente amenazado lince ibérico (*Lynx pardinus*) o el lince euroasiático (*Lynx lynx*), que ha sufrido un descenso severo de sus poblaciones en algunas áreas de Europa. El empleo de especies relacionadas como modelos para las especies amenazadas ha sido ampliamente reconocido (Wildt *et al.* 1986b, Pukazhenthi *et al.* 2006a).

El uso de espermatozoides maduros criopreservados es un aspecto muy importante dentro de las técnicas de reproducción asistida (ARTs) con el fin de estudiar y gestionar pequeñas poblaciones de animales salvajes (Pope *et al.* 2006b, Swanson 2006, Pukazhenthithi *et al.* 2007). La criopreservación de semen permite transportar la información genética del macho en o entre poblaciones sin ser necesaria la traslocación de animales (Pukazhenthithi *et al.* 2006a) y se ha reconocido como una aproximación de gran valor en la vinculación de poblaciones *in situ* y *ex situ* (Pukazhenthithi *et al.* 2006a, Swanson *et al.* 2007). Las especies y los individuos difieren en la capacidad de sus espermatozoides de sobrevivir a la criopreservación y es necesario comprender las bases subyacentes de estas diferencias (Yu *et al.* 2002, Leibo y Songsassen 2002). La criopreservación provoca un descenso en la proporción de espermatozoides móviles y con el acrosoma íntegro (Swanson y Wildt 1997). Ambos parámetros son esenciales para la capacidad fecundante de los espermatozoides (Howard 1993, Lengwinat 1994, Töpfer-Petersen 2000, Luvoni 2003b). En muchas especies de felinos, la alta proporción de espermatozoides anormales parece estar relacionada con la capacidad de los mismos de sobrevivir a la criopreservación; esta característica es también un factor determinante de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Pukazhenthithi *et al.* 2006c).

El análisis básico del semen aporta sólo información limitada con respecto a la capacidad de los espermatozoides para participar en la fecundación (Howard 1993, Luvoni 2006). Los esfuerzos en varias especies se han dirigido a la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Aunque el medio ideal para evaluar la capacidad fecundante es la inseminación artificial, en especies en peligro, o en especies en las cuales el número de individuos mantenidos en cautividad es muy limitado, esta aproximación no es factible y se necesitan otro tipo de ensayos. La funcionalidad de los espermatozoides puede examinarse usando oocitos de otras especies madurados *in vitro* almacenados en soluciones hiperosmóticas o frescos. En felinos salvajes, estudios recientes han demostrado la capacidad de los espermatozoides de fecundar oocitos de gato doméstico madurados *in vitro* (Swanson *et al.* 2006, Thiangtum *et al.* 2006, Stoops *et al.* 2007), pero no existen estudios que hayan evaluado la capacidad fecundante de los espermatozoides de lince rojo.

Los objetivos de este estudio fueron (a) caracterizar los rasgos del semen de lince rojo, (b) analizar la capacidad de los espermatozoides de lince rojo de sobrevivir *in vitro*, (c) valorar dos diluyentes de congelación para la criopreservación de espermatozoides de esta especie, examinando la motilidad espermática y la integridad acrosómica, y (d) evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados de lince rojo mediante fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico.

Material y métodos

Animales

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con la legislación española de protección animal (RD 1201/2005), conforme a la regulación de la Unión Europea 2003/65.

Los machos de lince rojo (de 3 - 8 años de edad) alojados en el Zoobotánico de Jerez (Jerez de la Frontera, Andalucía, España) se electroeyacularon entre la primavera de 2004 y el otoño de 2007. Un total de 4 machos fueron utilizados en 13 electroeyaculaciones. Dos de los machos tenían fertilidad demostrada. Todos los machos se encontraban en instalaciones que les permitían el contacto visual, olfativo y auditivo con hembras y machos de la misma especie. Las instalaciones tenían vegetación e iluminación natural, repisas y escondites. Los animales recibieron una dieta equilibrada a base de carne de pollo y vaca y, una vez a la semana, palomas vivas como enriquecimiento.

Recogida y evaluación de espermatozoides

La recogida de semen se realizó bajo anestesia general utilizando una inyección intramuscular de tiletamina-zolazepan (10 mg/kg de masa corporal) (Zoletil, Virbac, Carros, Francia). Los animales tuvieron un ayuno de alimento de 12 - 24 h, y de líquido de 2 h, antes de la anestesia. El nivel de anestesia alcanzado permitió un examen general y la recogida de semen mediante electroeyaculación. Ocasionalmente, la anestesia se suplementó con isoflurano pese al riesgo de relajación de esfínteres y la contaminación por orina. En cualquier caso, la contaminación del semen con orina fue rara y, cuando se produjo, la submuestra afectada se descartó.

Antes de la electroeyaculación se midieron el peso corporal y las dimensiones de los testículos. El volumen y peso de los testículos se calcularon a partir de sus medidas tal como se describe en la literatura (Harcourt *et al.* 1995), utilizando para cada testículo las fórmulas:

$$Volumen(mm^3) = longitud(mm) \times ancho(mm)^2 \times 0,524$$

$$Peso(g) = volumen_testículo(cm^3) \times 1,1(g/cm^3)$$

Posteriormente se calculó el peso relativo de testículos como:

$$Peso_relativo_testiculos = \frac{Peso_testiculos(g)}{Masa_corporal(g)}$$

La electroeyaculación se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Howard 1993). El voltaje fue aplicado con una sonda rectal (17,9 cm de longitud y 13,5 mm de diámetro) (P.T. Electronics, Boring, OR, USA), con tres electrodos longitudinales (35,8 mm), que se localizaron dentro del recto sobre la próstata y las glándulas bulbouretrales. Se aplicaron 100 estímulos eléctricos empleando un estimulador de corriente alterna a 60 Hz (P.T. Electronics). Los estímulos, en un rango entre 2 y 5 V, se aplicaron en grupos de 10 y la

secuencia total se dividió en 4 series. El semen se recogió en un recipiente de polipropileno estéril de 25 ml precalentado (Lab Center, Madrid, España). En cada serie se evaluó el volumen (medido con micropipeta) y el pH del semen (usando tiras reactivas; Medi-Test Combi 9, Machereg-Nagel, Düren, Alemania). Una alícuota de semen se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos (precalentados a 37°C) para examinar, empleando óptica de contraste de fase, el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento (usando una escala de 0 a 5, donde 0 indica ausencia de movimiento y 5 representa un movimiento rápido, lineal y progresivo (Howard 1986). Posteriormente se calculó el Índice de Motilidad Espermática (SMI):

$$SMI = \frac{\%móviles + (calidad \times 20)}{2}$$

En cada serie se fijaron 5 µl de semen con 45 µl de solución de glutaraldehído al 1% en tampón de cacodilato 0,165 M, pH 7,3. Con esta muestra se cargo un hemocitómetro para estimar la concentración espermática. Se fijó también una muestra de 10 µl de semen en 250 µl de paraformaldehído al 4% en una solución tampón con 110 mM de Na₂HPO₄ y 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4). Las muestras fijadas se almacenaron a 4°C y se procesaron más tarde para evaluar la morfología espermática y la integridad acrosómica.

El resto de la muestra de semen se diluyó con un volumen igual de medio F-10 de Ham tamponado con Hepes (Irvine Scientific, Izasa, Barcelona, España), suplementado con Gentamicina-50X para F-10 de Ham (Irvine Scientific, Izasa), que se suministró liofilizado y contenía 0,05 M de glutamina, 0,05 M de piruvato y 500 µg/ml de gentamicina, y se diluyó 1:50 en el medio F-10. El medio se suplementó además con L-glutamina (Sigma) (concentración final 2 mM), piruvato (Sigma) (concentración final 1 mM), una mezcla de triple antibiótico (Sigma, concentración final 130 IU/ml de penicilina, 130 µg/ml de estreptomicina y 260 µg/ml de neomicina, respectivamente) y 5% de suero fetal bovino inactivado (FBS) (Gibco Invitrogen, Barcelona, España) y filtrado (filtro de 0,22 µm). El semen diluido se almacenó a temperatura ambiente a la espera de completar las series de la electroeyaculación y ser más tarde utilizado para criopreservación.

Las muestras fijadas en paraformaldehído se tiñeron con azul de Coomassie (Larson y Miller 1999, Crosier *et al.* 2006) y se usaron para las valoraciones de morfología espermática e integridad acrosómica. Para teñirlas, las muestras se centrifugaron tres veces durante 8 min a 1700 xg (5000 rpm). Después de la primera y la segunda centrifugación, se retiró y eliminó el sobrenadante, y se añadieron 250 µl de solución de acetato de amonio 0,1 M. Tras la tercera centrifugación, el pellet fue diluido en 50 µl de la solución de acetato de amonio y extendido sobre dos portaobjetos que se dejaron secar a temperatura ambiente. Las extensiones se cubrieron con 40 µl de solución colorante de azul de Coomassie (0,22% de azul de Coomassie en 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial) durante 90 s, se lavaron con agua destilada y, una vez secos, se montaron con un cubreobjetos y medio DPX (BDH, Madrid, España). De

cada muestra se examinaron, en campo claro y a 1000x, un total 100 espermatozoides para analizar la morfología espermática y 100 espermatozoides más para evaluar la integridad acrosómica.

La morfología espermática (Fig. 3.1A) fue clasificada como normal, o con anomalías de cabeza (por ejemplo, macrocefálico, microcefálico, bicefálico), de pieza media (por ejemplo, anormal o doblada) o del resto de flagelo (por ejemplo, anormal o doblado). La presencia de gota citoplasmática se registró pero no se consideró una anomalía aparte y se utilizó como indicador de maduración espermática. Además se registró la presencia de colas enrolladas y cabezas sueltas.

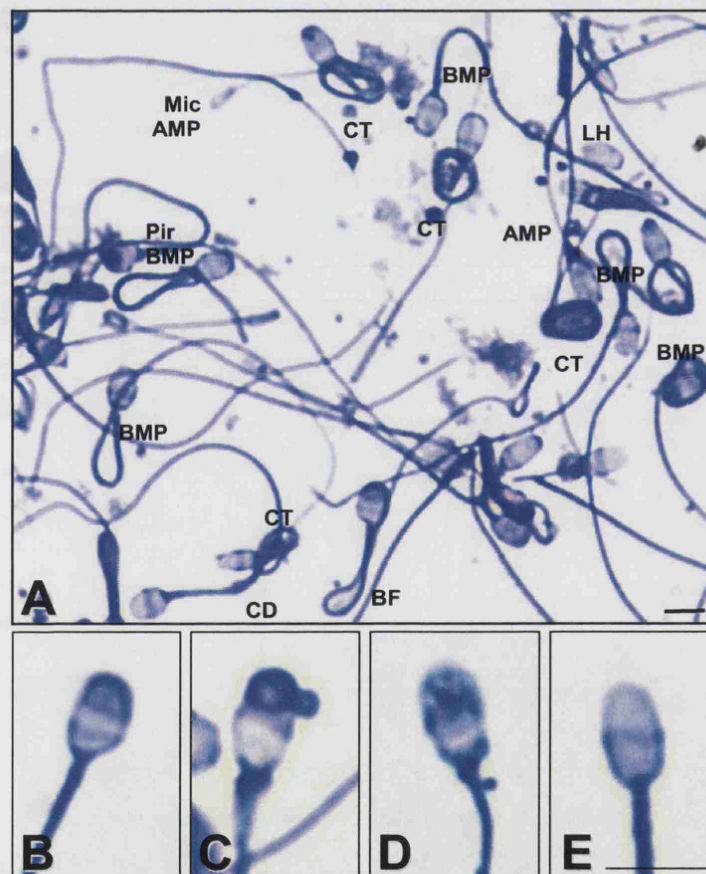


Fig. 3.1. Espermatozoides de lince rojo teñidos con azul de Coomassie y examinados usando óptica de campo claro (aumento total, 1000x). (A) Morfología espermática: N, normal; Mic, microcefálico; Pir, cabeza piriforme; AMP, pieza media anormal; BMP, pieza media doblada; BF, pieza principal doblada; CT, cola enrollada; LH, cabeza suelta. (B-E) Estado del acrosoma, (B) acrosoma normal intacto (C) acrosoma anormal intacto, (D) acrosoma dañado, (E) acrosoma perdido. Barras = 5 μ m.

La integridad acrosómica (Figs. 3.1B - E) se clasificó como: (1) intacto normal, espermatozoides con tinción oscura uniforme de la región acrosómica y sin teñir la región post-acrosómica; (2) intactos con acrosoma anormal, espermatozoides con tinción uniforme de la región acrosómica pero con una zona teñida más oscura en la región apical del acrosoma; (3)

dañado, espermatozoides con "parches" sin teñir en la región acrosómica; (4) no intacto o perdido, espermatozoides en los que la región acrosomal no está teñida o sólo se observa ligeramente teñida la banda ecuatorial (Pukazhenthil *et al.* 2006b).

Cuantificación de niveles de testosterona y cortisol

Se recogieron muestras de sangre y el suero se empleó para análisis de testosterona y cortisol mediante un ensayo inmunoquímico competitivo de quimioluminiscencia en fase sólida (Immulite® 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Incubación de espermatozoides en medios con diferentes sueros

La capacidad de los espermatozoides de lince rojo de sobrevivir *in vitro* fue examinada mediante incubación en medio F-10 de Ham modificado con Hepes, y con suplemento Gentamicina-50X, conteniendo L-glutamina, piruvato y triple antibiótico (como se ha descrito más arriba), y 5% (v/v) de FBS inactivado (Gibco) o 5% (v/v) de suero de lince rojo, éste último inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min y ambos filtrados a través de un filtro de 0,22 µm antes de su uso.

Se tomaron alícuotas de semen (7,5 µl) de la serie 2 de la electroeyaculación, y se diluyeron en 67,5 µl de medio F-10 con FBS o suero de lince rojo, que se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se incubaron en un bloque térmico seco, en atmósfera de aire, a 37°C. A 0, 1 y 2 h se tomaron muestras que se examinaron microscópicamente empleando óptica de contraste de fase para valorar motilidad y se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% para su posterior tinción con azul de Coomassie y valoración de la integridad acrosómica.

Criopreservación de espermatozoides

Se juntaron las muestras de semen de cada macho que tenían similar calidad (que no diferían en más de un 10% en el % de espermatozoides móviles), y que estaban diluidas en medio F-10 de Ham tamponado con Hepes y suplementado con 5% FBS. Una vez mezcladas las fracciones la muestra resultante se centrifugó a 300 - 700 xg (dependiendo de la calidad del semen) durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, se midió con micropipeta el volumen del pellet resultante de la centrifugación y se le añadió criodiluyente lentamente (1:4, v/v), gota a gota, a temperatura ambiente.

Se usaron dos criodiluyentes: (a) TEST, compuesto por 4,83% de Tes (Sigma), 1,15% de Tris (Sigma), 0,4% de glucosa, 200 IU de penicilina/ml, 200 µg estreptomicina/ml, 20% de yema de huevo y 4% de glicerol y (b) Biladyl, un diluyente comercial (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) compuesto por 2,42% de Tris, 1% de fructosa, 1,38% de ácido cítrico, 20% de yema de huevo y 4% de glicerol; este diluyente se suplementó con una mezcla de antibióticos que contenía tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina (Minitüb). El Biladyl se suministra

en dos soluciones (A y B, con 0% y 14% glicerol, respectivamente), que se mezclaron para obtener una concentración final de glicerol del 4%.

Las pajuelas de 0,25 ml (Minitüb) se cortaron por la mitad con unas tijeras y se utilizó la mitad con algodón y sellador en uno de sus extremos; la otra mitad se eliminó. Se cargaron en cada pajuela 50 µl de suspensión espermática en criodiluyente a temperatura ambiente y se cerraron con un sellador térmico (ERSA, Minitüb). Una vez cerradas todas las pajuelas se colocaron en un criovial de 5 ml para su refrigeración. Se colocó en un microtubo una alícuota de suspensión espermática para la evaluación de motilidad e integridad acrosómica finalizada la refrigeración.

La temperatura se hizo bajar de 20 a 5°C en 120 min utilizando un bloque seco programable (ThermoStat plus 5352, Eppendorf, Hamburg, Alemania) con una cámara a medida (CombiBox, Eppendorf) tal como se describe en el Anexo I. Se colocó dentro de la cámara una gradilla para soportar el criovial con las pajuelas y el microtubo con la submuestra para evaluación y se colocaron dentro de la cámara también dos sondas de un termómetro digital para hacer un seguimiento de la curva de refrigeración dentro de la cámara y dentro del criovial.

Finalizada la refrigeración las pajuelas se sacaron del criovial y se congelaron utilizando un sistema en dos pasos (Pukazhenthii *et al.* 2007) (Ver Figs. 1.8B y 1.9): se colocaron las pajuelas horizontalmente sobre una gradilla metálica, a 7,5 cm de la superficie del nitrógeno líquido, y se dejaron durante 1 min. Transcurrido ese tiempo se trasladaron rápidamente y en el mismo orden en el que se colocaron en el primer nivel, a un segundo nivel, a 2,5 cm sobre la superficie de nitrógeno líquido, donde se dejaron 1 min más antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido. Una vez congeladas las pajuelas se guardaron en un criovial y se organizaron en cañas que se transfirieron y almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

Descongelación y valoración de espermatozoides

Las pajuelas se descongelaron exponiéndolas durante 10 s al aire y sumergiéndolas durante 30 s en un baño de solución fisiológica (0,9%, p/v) estéril a 37°C (ver capítulo 1). El contenido de cada pajuela se depositó en un microtubo estéril de 1,5 ml precalentado en un bloque térmico seco a 37°C. Inmediatamente después de la descongelación, la suspensión espermática se diluyó 1:3 (v/v), gota a gota, con solución de Tyrode (como la usada para IVF; ver más abajo) que contenía 15 mM NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM de lactato de calcio, 1 mM de glutamina, penicilina y estreptomycin (100 µg/ml, de cada una) y 0,6% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA) (libre de ácidos grasos, Calbiochem, 1265479, Madrid, España). Se utilizó una alícuota de esta suspensión para la fecundación *in vitro*, ajustando la concentración final de espermatozoides a $1,5-4 \times 10^5$ espermatozoides móviles/ml, en cada gota de 50-100 µl, y cubierta con aceite mineral en una placa de cultivo de 35 mm. La

suspensión espermática restante se incubó a 38,5°C bajo atmósfera de 5% CO₂/aire y se valoraron submuestras en varios momentos (0, 1, 2 h) para análisis de motilidad e integridad acrosómica como se ha descrito anteriormente.

Recogida y maduración in vitro de oocitos

Se obtuvieron ovarios de gato doméstico procedentes de ovariectomías llevadas a cabo en clínicas veterinarias. Se transportaron al laboratorio a 5°C en un vial de 15 ml con 5 ml de solución fisiológica estéril de NaCl 0,9% (p/v) suplementada con penicilina-estreptomicina (100 µg/ml de cada una). Las muestras fueron procesadas según ha descrito Gómez y colaboradores (2003) con algunas modificaciones. Los ovarios se seccionaron longitudinalmente con una cuchilla de bisturí y los folículos se pincharon con dos agujas 21G para liberar los complejos cumulus-oocito (COCs) contenidos en los mismos. Para la recogida de oocitos se utilizó medio TCM-199 con Hepes (Sigma), suplementado con 15 mM de Hepes, 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 0,4% (v/v) de BSA (Sigma, A-8412) y penicilina y estreptomicina (100 µg/ml, de cada una). Después de varios lavados en el medio, se seleccionaron los COCs de grado I (calidad excelente) a grado III (calidad aceptable) y se transfirieron a una placa de cultivo de cuatro pocillos (Nunclon, Nalgene, Nunc International, Roskilde, Dinamarca) que contenía 500 µl de TCM-199 suplementado con 25 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 1,12 mM de cisteína, 0,4% (p/v) de BSA (Fraction V, Sigma, A-9418), 25 ng de EGF/ml (Merlo *et al.* 2005), FSH/LH ovina (Sigma, 10 µg/ml de cada una), 1 µg de estradiol/ml, penicilina y estreptomicina (100 µg/ml de cada una). Las placas se incubaron durante 24 h a 38,5°C en atmósfera de 5% CO₂/aire y humedad máxima.

Fecundación in vitro

Después de la maduración *in vitro*, los oocitos se coincubaron con espermatozoides congelados-descongelados de lince rojo. Los oocitos (10-20 por gota) se colocaron en gotas de 50-100 µl de solución de Tyrode con 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, penicilina y estreptomicina (100 µg/ml, de cada una) y 0,6% (p/v) de BSA (libre de ácidos grasos, Calbiochem, 1265479) (Gómez *et al.* 2003, Pope *et al.* 2006a). Los oocitos se incubaron, bajo aceite mineral, con $1,5-4 \times 10^5$ espermatozoides móviles/ml bajo aceite mineral en una atmósfera de 5% CO₂/aire con máxima humedad a 38,5°C durante 18-20 h.

Cultivo in vitro

Después del co-cultivo de gametos, los oocitos se transfirieron a una placa con medio de Tyrode tamponado con Hepes y se aspiraron dentro y fuera de una punta de pipeta para eliminar las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos. Los presuntos zigotos se pasaron a una placa de cultivo con 4 pocillos con 500 µl de solución de Tyrode con 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales del Medio Esencial Mínimo (MEM), 0,3% (p/v) de BSA (libre de ácidos grasos) y suplementada con 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM de lactato de calcio, 1 mM de glutamina y penicilina y estreptomicina (100 µg/ml de cada una) (medio IVC-1) (Gómez *et al.* 2003, Pope *et al.* 2006a). La incubación se llevó a cabo en atmósfera de 5% CO₂/aire con humedad máxima a 38,5 °C. La división se evaluó a las 44-48 h post-inseminación y el cultivo de los embriones se dio por finalizado en ese momento (con algunas excepciones; ver más abajo). Los oocitos no divididos se tiñeron con Hoechst 33342 (preparado en PBS y además diluido 1:10, v/v, en glicerol para alcanzar una concentración final de 10 µg/ml) para valorar el grado de maduración y fecundación y el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. A los embriones híbridos generados con espermatozoides de cada macho criopreservados en TEST, se les permitió progresar en el cultivo para evaluar el desarrollo. Para la incubación de embriones se utilizó un sistema de cultivo en tres pasos (Pope *et al.* 2006a). Brevemente, tras la evaluación de la división, los embriones se transfirieron al medio IVC-2 (similar al medio IVC-1, pero que además contenía 2%, v/v, de MEM con aminoácidos no esenciales, hasta el día 5 de cultivo. Después de ello, los embriones se transfirieron al medio IVC-3 (similar al medio IVC-2, pero con 10%, v/v, de FBS en lugar de BSA) hasta el día 7. El día de la fecundación se consideró como día cero. Al final de la incubación los embriones híbridos también se tiñeron y examinaron para contar el número total de núcleos.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos se analizaron con SPSS Versión 11.5. Los resultados se presentan como media±SEM. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. La comparación de parámetros espermáticos en primavera y otoño se realizó mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Witney.

Se utilizó ANOVA bifactorial de medidas repetidas (RM-ANOVA) para analizar los cambios de motilidad e integridad acrosómica en el tiempo durante la incubación en medio F-10 de Ham con diferentes sueros, o a lo largo del proceso de criopreservación en TEST o Biladyl. Cuando el RM-ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas, se valoró el efecto de cada factor, controlando por el otro factor.

Para el análisis de tasas medias de fecundación y división se examinó previamente, mediante ANOVA, si existían diferencias significativas entre la variabilidad de los eyaculados

de machos distintos y de los eyaculados de un mismo macho. Como no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambas, los eyaculados se consideraron como casos independientes. Las tasas de fecundación con espermatozoides criopreservados en TEST o Biladyl se compararon mediante el test no paramétrico de rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas. Las posibles relaciones entre motilidad e integridad acrosómica en fresco, tras la refrigeración, inmediatamente después de descongelar y durante la incubación post-descongelación, y de estos parámetros con las tasas de fecundación y división, se analizaron mediante correlación no paramétrica de rangos de Spearman.

Resultados

Características fenotípicas y seminales del macho de lince rojo

Entre Abril de 2004 y Noviembre de 2007 se llevaron a cabo 13 electroeyaculaciones en 4 machos diferentes. Se obtuvieron eyaculados con espermatozoides en 11 casos (85%). Se calcularon los parámetros seminales promedio en otoño y en primavera (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Características de testículo, endocrinológicas y seminales del lince rojo.

	Promedio (media \pm SEM)	Noviembre (otoño)	Abril (primavera)
Número de eyaculados	13	9	4
Edad	5,85 \pm 0,46	6,0 \pm 0,67	5,50 \pm 0,29
Masa corporal (kg)	10,93 \pm 0,63	11,14 \pm 0,72	10,45 \pm 1,36
Peso de testículos (g)	2,06 \pm 0,21	2,02 \pm 0,22	2,14 \pm 0,52
Peso relativo de testículos ($\times 10^{-4}$)	1,96 \pm 0,21	1,92 \pm 0,26	2,05 \pm 0,40
Testosterona (ng/ml)	0,90 \pm 0,15	0,79 \pm 0,09	1,33 \pm 0,70
Cortisol (μ g/dl)	13,95 \pm 1,73	12,49 \pm 1,79*	19,80 \pm 1,10*
Volumen eyaculado (μ l)	362,69 \pm 84,06	368,33 \pm 119,06	350,00 \pm 82,06
pH del semen	7,78 \pm 0,09	7,70 \pm 0,10	7,95 \pm 0,18
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	24,40 \pm 7,87	10,82 \pm 2,91*	60,59 \pm 12,44*
Nº total de espermatozoides ($\times 10^6$)	10,01 \pm 3,40	4,51 \pm 2,11*	24,69 \pm 4,78*
Motilidad (%)	55,71 \pm 5,76	50,48 \pm 5,25	67,92 \pm 14,07
Calidad de la motilidad (escala, 0-5)	2,71 \pm 0,23	2,45 \pm 0,21	3,30 \pm 0,46
Índice de Motilidad Espermática (SMI)	54,94 \pm 4,84	49,78 \pm 4,42	66,99 \pm 10,52
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	14,67 \pm 2,07	11,63 \pm 1,91*	21,78 \pm 1,61*
Acrosomas intactos (%)	43,66 \pm 3,79	47,96 \pm 4,23*	33,60 \pm 4,17*

Las características seminales corresponden al eyaculado completo. Los datos de edad, masa corporal, peso y peso relativo de testículos y hormonas corresponden a todos los intentos de recogida de semen. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre otoño y primavera ($p<0,05$).

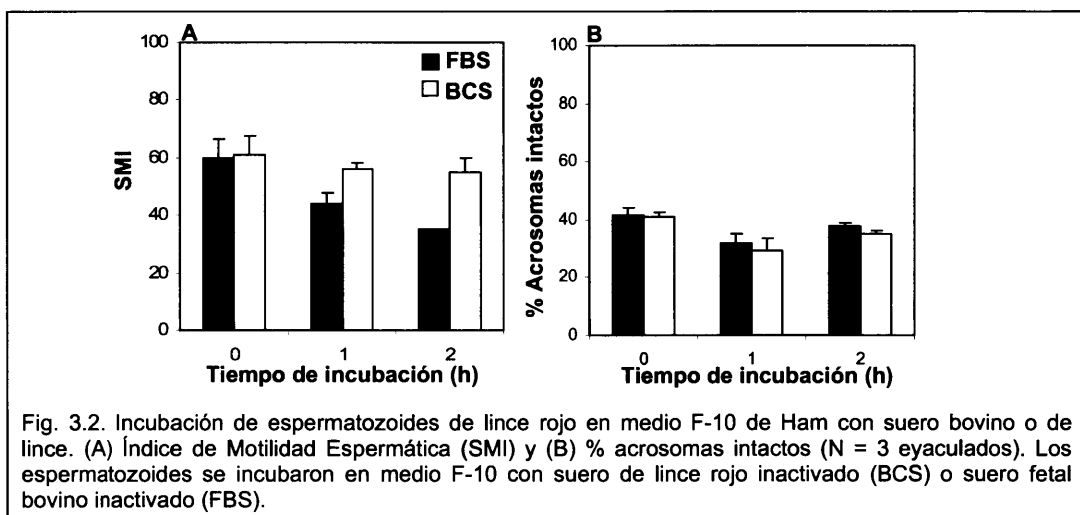
No hubo diferencias significativas entre los niveles de testosterona en Noviembre y en Abril pero sí entre los niveles de cortisol, con niveles más altos en primavera (Tabla 3.1).

El volumen de semen y la concentración espermática fueron bajos. Hubo diferencias significativas en la concentración entre los dos momentos de recogida de muestras. Los eyaculados contuvieron en promedio $4,5 \times 10^6$ espermatozoides totales en Noviembre y 25×10^6 espermatozoides totales en Abril y la diferencia entre ambos resultó estadísticamente significativa. Se encontró un valor promedio de 56% de espermatozoides móviles, con 50% de espermatozoides móviles en Noviembre y de 68% de espermatozoides móviles en Abril, y la diferencia no resultó estadísticamente significativa (Tabla 3.1).

Los lince rojos produjeron una proporción muy alta de espermatozoides pleiomórficos (promedio de 15% de espermatozoides normales). Hubo, en promedio, un 12% de espermatozoides normales en Noviembre (rango entre 4 y 17%) y un 22% de espermatozoides morfológicamente normales en Abril (rango entre 20 y 25%), resultando la diferencia entre ambos estadísticamente significativa. La proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto fue, en promedio, del 44%. La diferencia entre Noviembre (48% de acrosomas intactos) y Abril (34% de acrosomas intactos) también fue estadísticamente significativa (Tabla 3.1).

Efecto del suero

La incubación de espermatozoides de lince rojo en medio F-10 de Ham suplementado con suero de lince rojo inactivado dio como resultados que los espermatozoides no perdieran motilidad durante una incubación de 2 h, mientras que, la incubación en el mismo medio pero con FBS, sí mostró reducción de motilidad a lo largo del tiempo (Fig. 3.2A). La comparación entre medios con diferente suero mostró un mayor SMI al final de la incubación, cuando se suplementó el medio con suero de lince rojo, que cuando se añadió FBS (SMI 55,0 vs 35,0, respectivamente), aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Por otra parte, no hubo cambios significativos en la integridad acrosómica a lo largo del tiempo o entre los medios con diferente suero (35,0 vs 38,0 % espermatozoides con acrosoma intacto a las 2 h de incubación) (Fig. 3.2B).



Criopreservación de espermatozoides de lince rojo

Tres de los cuatro lince rojos produjeron semen de calidad suficiente para criopreservar (SMI de 55 o superior). Se emplearon en los estudios de criopreservación 7 de los 11 eyaculados con espermatozoides (64%). Se observaron considerables diferencias en SMI (52,0 – 84,7) y en % de acrosomas íntegros (26,8 - 41,3%) entre eyaculados.

No hubo descenso significativo de la motilidad después de la refrigeración y de la congelación-descongelación en los espermatozoides diluidos en TEST, pero sí se observaron diferencias significativas después de la descongelación, a las 3 h de incubación ($p < 0,05$) (Fig. 3.3A). Por otra parte, no hubo diferencias significativas en el % de acrosomas intactos después de la congelación-descongelación o durante la incubación post-descongelación (Fig. 3.3B). En los espermatozoides diluidos en Biladyl se detectó diferencia significativa ($p < 0,05$) en motilidad entre los espermatozoides frescos y los descongelados, pero no se produjo después un descenso significativo durante la incubación post-descongelación (Fig. 3.3A). Hubo descenso significativo ($p < 0,05$) de la integridad acrosómica después de descongelar en relación a los valores registrados antes de congelar (Fig. 3.3B).

Hubo aparentes diferencias entre criodiluyentes desde el inicio del proceso de criopreservación (68,2 vs 60,0 SMI en TEST y Biladyl, respectivamente) que parecen mantenerse tras la descongelación (49,2 vs 41,3 SMI) y más tarde, después de una incubación de 1 h (42,5 vs 30,0 SMI); sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanzó la significación estadística. En general, la criopreservación en TEST resultó mejor para la motilidad que la realizada en Biladyl ($31,7 \pm 3,3$ vs $12,5 \pm 0,0$ SMI después de 3 h de incubación post-descongelación, respectivamente), aunque no se detectaron diferencias significativas (Fig. 3.3A).

Se ha argumentado que el porcentaje de espermatozoides normales y con acrosoma íntegro en el semen fresco pueden ser mejor predictor de la supervivencia a la descongelación que la motilidad espermática (Pukazhenthil *et al.* 2007). Por ello se examinó la posible relación entre características espermáticas en el semen fresco y el SMI a la descongelación. No se encontró relación entre el % de espermatozoides normales en el semen fresco y la motilidad a la descongelación. Sí se observaron, sin embargo, relaciones significativas entre el % de acrosomas íntegros en el semen fresco y después de la refrigeración con el SMI a la descongelación y tras 1 h de incubación post-descongelación ($p=0,01$).

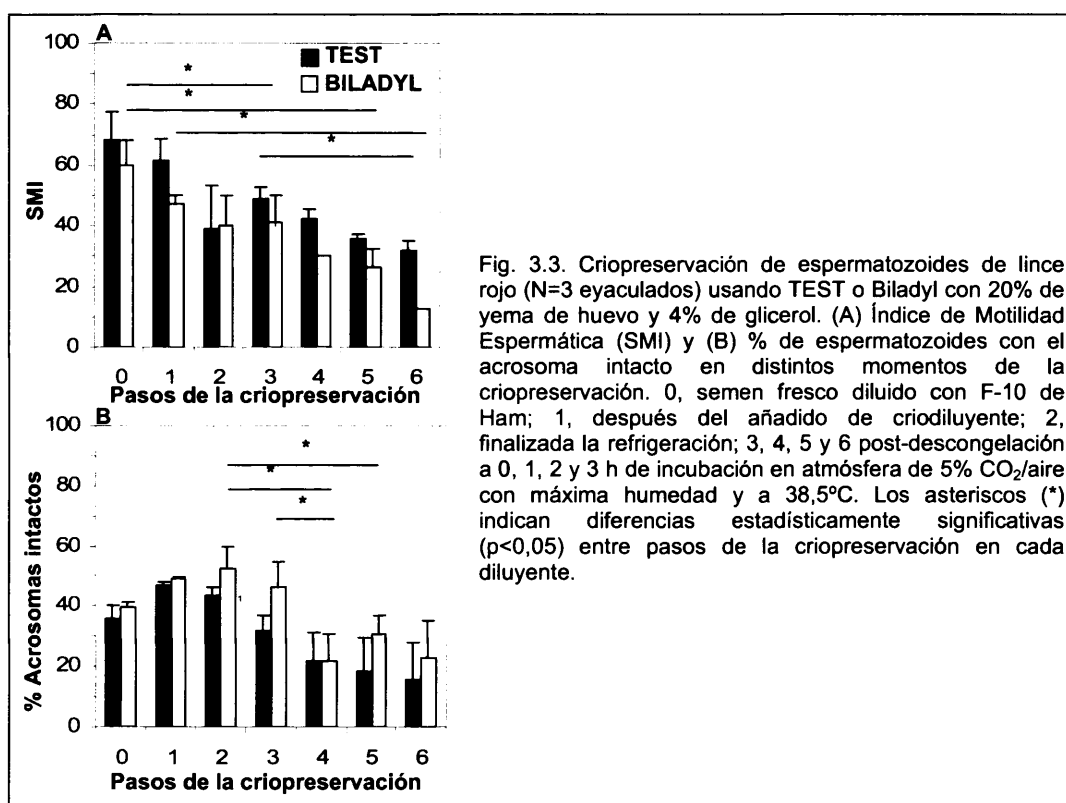


Fig. 3.3. Criopreservación de espermatozoides de lince rojo ($N=3$ eyaculados) usando TEST o Biladyl con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol. (A) Índice de Motilidad Espermática (SMI) y (B) % de espermatozoides con el acrosoma íntegro en distintos momentos de la criopreservación. 0, semen fresco diluido con F-10 de Ham; 1, después del añadido de criodiluyente; 2, finalizada la refrigeración; 3, 4, 5 y 6 post-descongelación a 0, 1, 2 y 3 h de incubación en atmósfera de 5% CO_2 /aire con máxima humedad y a $38,5^{\circ}C$. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre pasos de la criopreservación en cada diluyente.

Fecundación in vitro de oocitos de gato doméstico madurados in vitro con espermatozoides de lince rojo congelados-descongelados

Se ha encontrado que los espermatozoides de lince rojo pueden fecundar oocitos de gato doméstico, con zona pelúcida, madurados *in vitro* (Fig. 3.4). El porcentaje de fecundación varió ligeramente entre machos, y considerablemente entre el momento del año en el que se realizó la recogida y entre criodiluyentes. Los espermatozoides de los machos recogidos en Abril (primavera) y criopreservados en TEST mostraron altas tasas de fecundación: 45 de los 98 oocitos maduros (46%) fueron fecundados (Tabla 3.2). Sin embargo, los espermatozoides

recogidos en Noviembre (otoño) y criopreservado en TEST, consiguieron fecundar sólo 5 de 29 oocitos maduros (17%). Además, aunque solo fue posible la comparación con un número limitado de casos criopreservados en TEST y Biladyl, quedó claro que los espermatozoides en Biladyl lograron tasas de fecundación muy bajas. Se encontró que los espermatozoides conservados en TEST fecundaron 50 de 127 (39,3%) oocitos maduros, mientras que los conservados en Biladyl fecundaron 1 de 34 (2,9%) oocitos maduros disponibles.

Los oocitos fecundados se dividieron en cultivo. El porcentaje de división sobre los oocitos maduros fue 24,4% (31/127) para los espermatozoides criopreservados en TEST y 2,9% (1/34) para los conservados en Biladyl.

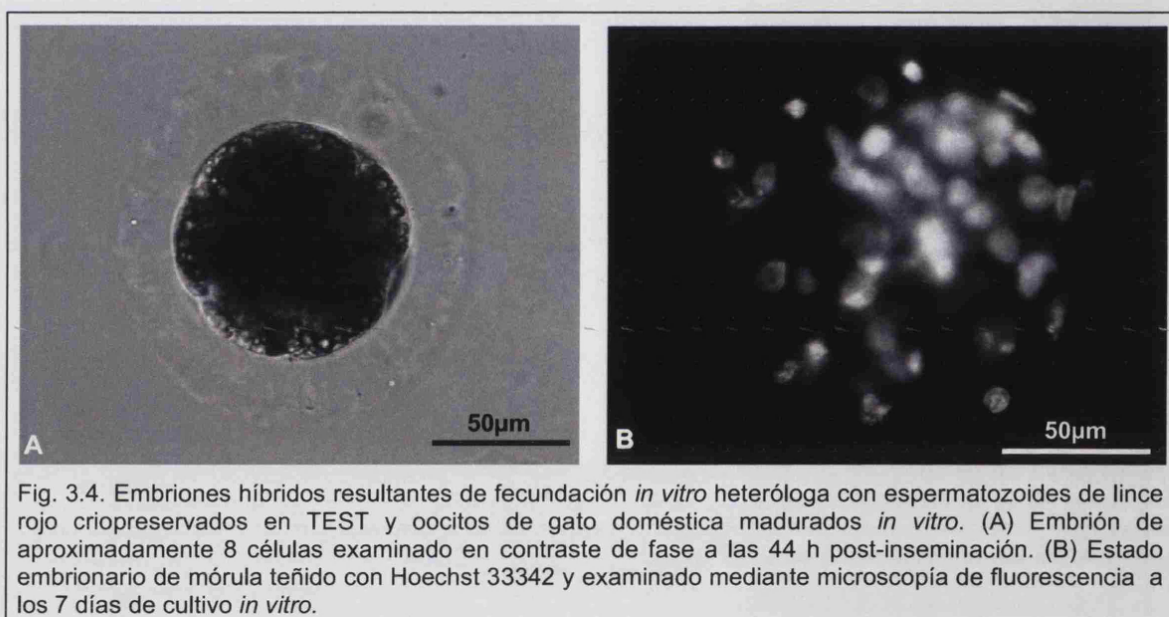


Fig. 3.4. Embriones híbridos resultantes de fecundación *in vitro* heteróloga con espermatozoides de lince rojo criopreservados en TEST y oocitos de gato doméstica madurados *in vitro*. (A) Embrión de aproximadamente 8 células examinado en contraste de fase a las 44 h post-inseminación. (B) Estado embrionario de mórula teñido con Hoechst 33342 y examinado mediante microscopía de fluorescencia a los 7 días de cultivo *in vitro*.

Tabla 3.2. Fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos madurados *in vitro* con espermatozoides de lince rojo criopreservados en TEST con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol (N = 3).

	Noviembre	Abril
Nº de oocitos fecundados / Nº total de oocitos (%)	5/59 (8,5%)	45/122 (36,9)
Nº de oocitos fecundados / Nº de oocitos maduros (%)	5/29 (17,2)	45/98 (46,0)
Nº espermatozoides adheridos por oocito maduro	0,79	2,65
Nº de oocitos divididos / Nº de oocitos fecundados (%)	5/5 (100)	26/45 (57,8)
Nº de oocitos divididos / Nº de oocitos maduros (%)	5/29 (17,2)	26/98 (26,5)

La concentración espermática fue $1,5-4 \times 10^5$ espermatozoides móviles/ml. Los gametos fueron co-incubados durante 18-20 h. El porcentaje de oocitos divididos se evaluó a las 44 - 48 h de cultivo post-inseminación. El porcentaje de oocitos divididos se evaluó después de 44 - 48h de cultivo después de la inseminación. Los oocitos no divididos se tiñeron con Hoechst 33342 (10 µg/ml) para valorar retrospectivamente el grado de maduración y la fecundación.

En dos ocasiones, los embriones híbridos obtenidos con espermatozoides criopreservados en TEST se cultivaron *in vitro* hasta el día 7 para explorar si ocurría la progresión hasta el estado de blastocisto. El máximo desarrollo alcanzado por estos embriones híbridos fue hasta el estado de mórula. De los 26 embriones cultivados hasta el día 7, se encontró 1 en estado de 4 células, 18 que contenían entre 16 - 30 núcleos y 7 que se habían desarrollado hasta el estadio de ≥ 32 células.

Se han detectado relaciones positivas y significativas entre la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto después de la descongelación y la proporción de los oocitos fecundados ($p < 0,01$) y la proporción de oocitos divididos ($p < 0,01$).

Discusión

Este estudio ha permitido caracterizar el eyaculado de lince rojo obtenido mediante electroestimulación bajo anestesia general, examinar la criopreservación de espermatozoides usando dos diluyentes distintos, y valorar la funcionalidad espermática tras la descongelación mediante fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*.

Se observó un amplio rango en el número total de espermatozoides en cada eyaculado ($0,2 - 33,5 \times 10^6$ espermatozoides). Los valores fueron, en general, bajos en comparación con los registrados para otros felinos de mediano tamaño (por ejemplo, ocelote (*Leopardus pardalis*): Stoops *et al.* 2007; gato pescador (*Prionailurus viverrinus*): Thiangtum *et al.* 2006; serval (*Leptailurus serval*): Pukazhenthil *et al.* 2002). No obstante, el número total de espermatozoides obtenido en este estudio (media de 10×10^6 espermatozoides /eyaculado) fue superior al descrito para la especie en trabajos anteriores (una media calculada de $0,78 \times 10^6$ espermatozoides totales por eyaculado; Howard 1993). Además, los valores fueron también más altos que los que se han registrado en otras especies de lince como el lince ibérico ($0,07 - 17,42 \times 10^6$ espermatozoides totales; ver capítulo 5) o el lince euroasiático, ($1,6 - 2,9 \times 10^6$ espermatozoides totales; Jewgenow *et al.* 2006). Las diferencias entre nuestros resultados y los de otros autores podrían estar relacionadas con la edad de los animales, la época de muestreo, o las condiciones de cautividad en las que se encuentran los animales. Parece que las diferencias se debieron en parte al momento del año en el que se recogen los eyaculados (ver más abajo) pero también, en nuestro caso, a las diferencias entre machos, con un macho produciendo un alto número total de espermatozoides.

La proporción de espermatozoides móviles en el eyaculado del lince rojo (promedio de 56%) fue similar a la encontrada en un trabajo anterior (Howard 1993). Este valor también fue similar a la proporción de espermatozoides móviles registrada en el lince euroasiático (55% espermatozoides móviles durante estación reproductiva; Jewgenow *et al.* 2006) pero menores que los hallados en el lince ibérico (alrededor del 80 - 86% antes de la época reproductiva; ver capítulos 4 y 5), o en otros felinos de mediano tamaño como el caracal (85%; Howard 1993),

serval (73%; Pukazhenth et al. 2002), gato pescador (73%; Thiangtum et al. 2006) o el ocelote (83%; Stoops et al. 2007).

El eyaculado del lince rojo contiene una baja proporción de espermatozoides normales ($14,67 \pm 2,07$), de acuerdo con lo observado en estudios anteriores con esta especie (Howard 1993) y que resulta ligeramente inferior que los valores observados en otras especies de lince como el lince euroasiático (Jewgenow et al. 2006) o el ibérico (capítulos 4 y 5). Estas observaciones sitúan a los lince en la parte más baja de la clasificación de los felinos atendiendo a la proporción de espermatozoides morfológicamente normales (Pukazhenth et al. 2006c, ver Fig. 1 de la Discusión General).

La proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto en el eyaculado de lince rojo osciló entre 27 y 60% y fue similar al observado en el lince euroasiático (Howard 1993) y en el lince ibérico (capítulos 4 y 5), aunque queda lejos de lo observado en otras especies de felinos de mediano tamaño como el gato pescador, que presenta eyaculados con 83 - 94% de espermatozoides con el acrosoma intacto (Thiangtum et al. 2006).

Una comparación de los eyaculados recogidos en Noviembre (otoño), justo antes del inicio de la época de cría, y en Abril (primavera), hacia el final de la estación, nos permitió identificar cambios en las características seminales. En Noviembre, los eyaculados contuvieron menos espermatozoides y con menor proporción de espermatozoides normales, aunque con mayor proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto. No obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas en peso de testículos, o peso relativo de testículos, lo cual indica que el incremento en el peso de testículos, de haberlo, es anterior a un incremento en la producción de espermatozoides. Los cambios estacionales en el número de espermatozoides y la calidad del semen han sido descritos en un gran número de especies, incluyendo felinos, y se sabe que también afectan la función espermática (leopardo: Haas van Dorsser y Strick 2005, lince euroasiático: Jewgenow et al. 2006, gato de Pallas: Swanson et al. 2006). La gestión de programas de cría en cautividad puede requerir de la evaluación de la salud reproductiva de los animales cautivos, incluyendo la recogida de semen y su evaluación, para monitorizar la capacidad reproductiva potencial de los machos. Esto se lleva a cabo antes de la estación reproductiva. Por tanto, en base a los resultados de este estudio debería tenerse en cuenta que la calidad del eyaculado puede estar en ese momento por debajo del óptimo alcanzado durante el pico de la época reproductiva. Además, no se dispone de información sobre las características seminales de lince rojos en libertad de forma que no es posible discutir sobre las diferencias entre los eyaculados de individuos cautivos y libres.

Se ha examinado la supervivencia de los espermatozoides de lince rojo en medio F-10 de Ham tamponado con Hepes y suplementado con suero fetal bovino o con suero de lince rojo (ambos inactivados y filtrados antes de su uso). Debido a que el medio F-10 se utiliza habitualmente con espermatozoides de otros felinos (ocelote: Stoops et al. 2007; tigre:

Donoghue *et al.* 1992b, Johnston *et al.* 1992; puma y león: Johnston *et al.* 1992; guepardo: Donoghue *et al.* 1992a), se investigó si alguno de estos sueros eran adecuados para la dilución de espermatozoides de lince rojo antes de la preparación de estos para la criopreservación. No se observó descenso significativo de la motilidad espermática, ni de la integridad acrosómica durante una incubación durante 2 h, y no se encontraron diferencias significativas entre sueros, aunque el suero de lince rojo parece proporcionar mayor supervivencia. Se requieren más estudios para aclarar si el suero homólogo de lince rojo efectivamente resulta mejor para la supervivencia y por tanto resulta ser mejor opción como suplemento a los medios.

Los espermatozoides de lince rojo fueron criopreservados con éxito usando un protocolo previamente utilizado para otros felinos (Crosier *et al.* 2006, Stoops *et al.* 2007). La proporción media de espermatozoides móviles post-descongelación fue mayor en las muestras diluidas en TEST con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol, con alrededor del 50% de espermatozoides móviles y SMI ~50 post-descongelación. Estos resultados fueron mejores que la supervivencia después de la congelación utilizando un método similar en el lince ibérico (entorno al 34% de espermatozoides móviles y SMI 43 después de descongelar; ver capítulo 5), o en el ocelote (25% de espermatozoides móviles, SMI 40; Stoops *et al.* 2007) y fueron similares a los resultados de otros felinos de mediano tamaño (gato pescador: 38 - 65% de espermatozoides móviles, SMI 51 - 65; Thiangtum *et al.* 2006, tigrina: SMI 49; Baudi *et al.* 2008). Aunque bastante bajo, el porcentaje de acrosomas intactos post-descongelación fue consistente con los valores encontrados en otros felinos salvajes de talla media (lince ibérico: 39%; ver capítulo 5, gato pescador: 30 - 50%; Thiangtum *et al.* 2006, ocelote: 40 - 50%; Stoops *et al.* 2007). La criopreservación en Biladyl reveló resultados similares a los observados con TEST pero con tendencia a un mayor deterioro de la motilidad durante la incubación post-descongelación.

El ensayo de fecundación *in vitro* heteróloga reveló que los espermatozoides criopreservados de lince rojo son capaces de fecundar oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*. Las tasas de fecundación fueron altas, de alrededor del 46% de los oocitos maduros con los espermatozoides recogidos en Abril y criopreservados en TEST. Cuando se comparan estos resultados con los de otras especies se observa que son semejantes a los hallados con espermatozoides de gato de Pallas (Swanson *et al.* 2006) pero menores que los obtenidos con espermatozoides de gato pescador (Thiangtum *et al.* 2006), o de ocelote (Stoops *et al.* 2007) utilizando condiciones similares, con los que se lograron tasas de fecundación de entre el 62 - 70%. Es interesante destacar que, pese a la inexistencia de diferencias significativas en motilidad o integridad acrosómica a la descongelación entre las muestras de lince rojo criopreservadas en TEST y en Biladyl, la fecundación heteróloga reveló que los espermatozoides criopreservados en Biladyl exhiben una reducida capacidad fecundante. Este resultado es importante debido a que pone en evidencia la necesidad de utilizar pruebas

funcionales para valorar los métodos de criopreservación. Además, revela que la capacidad fecundante de los espermatozoides pueden evaluarse en el laboratorio cuando no es posible utilizar otras pruebas como la inseminación artificial o la fecundación *in vitro* homóloga.

Después de la fecundación heteróloga, los embriones híbridos se dividieron durante el cultivo *in vitro*. El porcentaje de oocitos maduros y fecundados que se dividió en cultivo tras la fecundación con espermatozoides de lince rojo fueron mayores que los obtenidos con espermatozoides de lince ibérico (14% y 56%, respectivamente; ver capítulo 5), pero fueron menores que los resultados obtenidos en otros felinos de mediano tamaño (gato pescador: el 53% de oocitos maduros se dividen; Thiangtum 2006, ocelote: 64% de oocitos maduros se dividen; Stoops *et al.* 2007).

En conclusión, el presente trabajo nos ha permitido realizar una caracterización del eyaculado de lince rojo y una valoración de la criopreservación de espermatozoides en esta especie, junto con la fecundación *in vitro* heteróloga de los espermatozoides descongelados. Los resultados de este estudio revelan que (a) es posible recoger y criopreservar semen de lince rojos cautivos, obteniendo los mejores resultados en TEST con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol, (b) las características del semen son similares a las de otros felinos de mediano tamaño y mejores que las de otras especies de lince, (c) no hubo diferencias entre el suero fetal bovino y el suero homólogo inactivados cuando se añaden al medio F-10 de Ham tamponado con Hepes y se utilizan para valorar la supervivencia espermática *in vitro*, y (d) la funcionalidad de los espermatozoides de lince rojo congelados - descongelados puede evaluarse mediante fecundación *in vitro* heteróloga usando oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*.

Capítulo 4

Rasgos reproductivos del macho de lince ibérico (*Lynx pardinus*)



Resumen

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) se considera el felino más amenazado del mundo. Están en marcha acciones de conservación *in situ* y *ex situ* y se ha organizado un banco de recursos genéticos con el fin de disponer de información para una adecuada gestión genética de las poblaciones *in situ* y *ex situ* y para facilitar la futura conexión entre ambas. Se han examinado las características endocrinas y seminales de los machos de vida libre y cautivos de diferentes edades, la asociación entre rasgos del eyaculado y se han evaluado vínculos entre éstos y la fertilidad de los machos. Las características fenotípicas, hormonales y seminales se recopilaron a partir de 18 machos diferentes. Los eyaculados de machos adultos mostraron las siguientes características (media \pm SEM: $5,57\pm 1,04 \times 10^6$ espermatozoides totales, $77,05\pm 2,85\%$ espermatozoides móviles, $30,62\pm 2,48\%$ morfológicamente normales y $54,28\pm 3,89\%$ espermatozoides con acrosoma intacto. El nivel de testosterona fue $0,84\pm 0,10$ ng/ml y el peso de testículos $2,52\pm 0,10$ g. La madurez sexual en los machos se alcanzó al superar los 3 años de edad. No se encontraron diferencias en los caracteres seminales entre los machos cautivos y los de vida libre, ni entre los eyaculados recogidos antes y después de la época reproductiva. Por otra parte se encontraron diferencias significativas entre las cuatro series de estímulos de la electroeyaculación, con mayor número total de espermatozoides en la primera serie. El peso relativo de testículos y el número total de espermatozoides del eyaculado correlacionaron significativamente con el número de cópulas, mientras que el porcentaje de espermatozoides móviles correlacionó significativamente con el número de cachorros por hembra. Esta es la primera caracterización de los rasgos endocrinológicos y seminales en machos de lince ibérico cautivos y en libertad; esta información nos permitirá desarrollar valoraciones del potencial reproductor de los machos, la criopreservación de semen, y métodos de reproducción asistida en esta especie en peligro crítico.

Introducción

El lince ibérico se considera el felino más amenazado del mundo y el carnívoro más amenazado de Europa (Nowell y Jackson 1996). Es el único felino incluido en la categoría “en peligro crítico” de la Lista Roja de la IUCN/SSC (IUCN 2008).

El lince ibérico es endémico de la península Ibérica y en el pasado se distribuía por toda ella (Blanco 1998, Rodríguez 2007), aunque la actual población en libertad tiene menos de 200 individuos (Guzmán *et al.* 2002) distribuidos en dos poblaciones reproductivamente aisladas (Johnson *et al.* 2004) que habitan en el sur de España (Blanco 1998, Rodríguez y Delibes 2003, Rodríguez 2007). Recientemente, se han presentado evidencias de la presencia de lince ibérico en el centro de España (Alda *et al.* 2008). Se presume que son los factores antrópicos la principal causa del declive poblacional de esta especie (Rodríguez y Delibes 2004).

Se sabe poco sobre la biología reproductiva del lince ibérico. La época de cría tiene lugar habitualmente entre los meses de diciembre y febrero, con un pico en el estro de las hembras en enero. Los nacimientos se concentran en las dos últimas semanas de marzo y los primeros días de Abril, aunque las hembras pueden tener un segundo celo más tarde, de forma que, se cree que pueden ocurrir nacimientos casi durante todo el año (Fernández *et al.* 2002). Los machos no suelen reproducirse antes de los 2-3 años de edad. Los individuos mayores de 10 años probablemente no críen, aunque se han registrado casos de animales viejos que han producido camadas (Blanco 1998).

Durante muchos años los esfuerzos de conservación se han centrado exclusivamente en la ecología y la conservación *in situ* del lince ibérico (Valverde 1963, Delibes 1979, Palomares *et al.* 2001, 2005, Fernández *et al.* 2002). Recientemente se ha iniciado un programa de conservación *ex situ*, que incluye la cría en cautividad y un banco de recursos genéticos, con el objetivo de mantener una población cautiva genética y demográficamente gestionada y de generar nuevas poblaciones de vida libre mediante reintroducción de animales en la naturaleza (Vargas *et al.* 2007, 2008). La primera camada nació en cautividad en el año 2005, y desde entonces, en los siguientes años, han nacido varias camadas más (ver Introducción General).

La conservación del lince ibérico abordada desde las dos aproximaciones, *in situ* y *ex situ*, se beneficiará del uso de técnicas de reproducción asistida (Wildt 1990, Lasley *et al.* 1994, Pukazhenthi y Wildt 2004, Roldan y Garde 2004, Pope *et al.* 2006b, Swanson 2006) que permitirían el flujo genético entre poblaciones distantes en el espacio o en el tiempo (Pukazhenthi *et al.* 2006a, Swanson *et al.* 2007, Roldan y Gomendio 2009). En particular, la recogida, evaluación y conservación de espermatozoides requerirá conocimiento básico sobre la reproducción del lince (Wildt 1994, Wildt *et al.* 1995) para el desarrollo de criopreservación

espermática e inseminación artificial, y para los exámenes reproductivos antes del comienzo de la época de cría. Los rasgos reproductivos pueden estar afectados por una variedad de factores como la edad o las diferencias entre machos la cual, en parte, puede ser resultado de la variabilidad genética individual, o de factores ambientales como la estación o situación vital (ej. vida en cautividad o en libertad).

La variabilidad genética en las poblaciones actuales de lince ibérico es baja (Jonson *et al.* 2004) y se ha identificado una posible relación entre la consanguinidad y las características reproductivas en otras especies de felinos como el guepardo (*Acinonyx jubatus*; Wildt *et al.* 1983, 1987b, Roth *et al.* 1995), la pantera de Florida (*Puma concolor coryi*; Barone *et al.* 1994) y el león (*Panthera leo*; Wildt *et al.* 1987a). Se conoce la influencia de la edad sobre parámetros de calidad seminal, mostrando los animales jóvenes (subadultos) rasgos subóptimos (ej. guepardo; Crosier *et al.* 2007). Las diferencias estacionales pueden estar relacionadas con cambios en el fotoperiodo, la temperatura o la disponibilidad de alimento. Se sabe que la estación tiene un fuerte impacto sobre la reproducción de las hembras pero poco se conoce del efecto que tiene sobre la capacidad reproductiva de los machos. Los machos de algunas especies de felinos son marcadamente estacionales como el gato de Pallas (*Otocolobus manul*; Swanson *et al.* 1996a), la pantera de las nieves (*Panthera uncia*; Johnston *et al.* 1994), el leopardo de Arabia (*Panthera pardus nimr*; Haas van Dorsser y Strick 2005), el lince euroasiático (*Lynx lynx*; Jewgenow *et al.* 2006) y el lince rojo (*Lynx rufus*; capítulo 3). A diferencia de los anteriores, los felinos que viven en los trópicos no muestran un periodo reproductivo marcado, como es el caso del caracal (*Caracal caracal*; Bernard y Stuart 1987), el ocelote (*Leopardus pardalis*; Morais *et al.* 2002), la tigrina (*Leopardus tigrinus*; Morais *et al.* 2002), el margay (*Leopardus wiedii*; Morais *et al.* 2002), el jaguar (*Panthera onca*; Morato *et al.* 2004), o la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*; Wildt *et al.* 1986a). Puesto que el lince ibérico habita en zonas templadas es posible que los machos de esta especie produzcan espermatozoides durante varios meses. La comparación entre poblaciones cautivas y en libertad ha revelado diferencias entre especies en cuanto a rasgos reproductivos. Mientras que el guepardo, el gato de Pallas o el gato de patas negras (*Felis nigripes*) tienen espermatozoides de calidad similar con independencia de su estado (Wildt *et al.* 1983, 1987b, 1993, Swanson *et al.* 2007), el jaguar en cautividad presenta calidad seminal pobre (Morato *et al.* 2001). Por último los rasgos espermáticos y su capacidad funcional pueden variar también dependiendo de si son recogidos mediante electroeyaculación o a partir de los epididimios de animales que mueren. Los resultados obtenidos en gato doméstico (*Felis catus*) sugieren que hay pocas diferencias entre espermatozoides eyaculados o epididimarios, tanto frescos como después de criopreservación (Luvoni 2006, Tebet *et al.* 2006).

Los objetivos de este estudio son (a) caracterizar los parámetros seminales del lince ibérico, (b) valorar el efecto de la edad sobre la calidad seminal, (c) comparar parámetros

espermáticos entre machos cautivos y en libertad, (d) examinar las relaciones entre caracteres espermáticos, (e) comparar las características reproductivas del macho antes y después de la época de cría, (f) comparar parámetros en espermatozoides eyaculados y epididimarios, y (g) valorar las posibles relaciones entre características seminales y fertilidad del macho.

Material y métodos

Animales

Se mantuvieron lince ibéricos (Fig. 4.1A) cautivos en tres centros de cría: “El Acebuche” (Parque Nacional de Doñana, Huelva), “La Olivilla” (Sierra Morena, Jaén) y “Zoobotánico Jerez” (Jerez de la Frontera, Cádiz), todos en España. Los machos (1 - 8 años de edad) se electroeyacularon antes de la época de cría en 2005, 2006 y 2007. Todos los machos procedían de la naturaleza, con la excepción del macho con número de Stud Book (SB) 14, que fue el primer macho nacido en cautividad. Los animales se mantuvieron en cercados individuales, en condiciones seminaturales, dentro de instalaciones que les permiten tener contacto visual, olfativo y auditivo con hembras y machos de la misma especie. Los cercados presentan vegetación mediterránea mixta natural. Los animales se alimentaron con una dieta equilibrada, basada principalmente en conejos vivos de granja y cadáveres de conejo suplementados con vitaminas.

Los machos de vida libre (2 - 11 años de edad) habitaban en el área de Doñana, Huelva, España. Los animales se electroeyacularon antes de la época de cría de 2006. Todos los machos se capturaron con jaula-trampa en el campo y se liberaron otra vez dentro de su territorio una vez se hubieron repuesto por completo de la anestesia.

La manipulación de los animales se hizo de acuerdo con la legislación española (RD1201/2005) de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, adaptada a la legislación de la Unión Europea 2003/65, y con los permisos necesarios de la Consejería de Medio Ambiente, de la Junta de Andalucía, de España.

Recogida y evaluación de espermatozoides

Para la recogida de semen los machos fueron anestesiados con tiletamina - zolazepam (10 mg/kg de masa corporal) (Zoletil, Virbac, Carros, Francia) o con ketamina (5 mg/kg)(Imalgene 1000, Merial, Lyon, Francia) mezclada con medetomidina (50 µg/kg) (Domptor, Orion Pharma, Spoo, Finlandia). Los efectos de la medetomidina se revirtieron mediante la inyección de atipamezol (250 µg/kg) (Antisedan, Pfizer, Madrid, España).

Antes de la electroeyaculación se midieron la masa corporal y las dimensiones de los testículos. El volumen y peso de los testículos se calcularon a partir de sus medidas tal como describieron Harcourt *et al.* (1995). Posteriormente se calculó el peso relativo de testículos como el cociente entre el peso de ambos testículos y la masa corporal (ver capítulo 3).

Las electroeyaculaciones se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Howard (1993). El voltaje se aplicó mediante una sonda rectal lubricada (de 17,9 cm de longitud y 13,45 mm de diámetro) (P.T. Electronics, Boring, OR, USA), con tres electrodos longitudinales en el extremo (de 35,7 mm de longitud). La sonda se colocó en el recto del animal con los electrodos orientados ventralmente al nivel de la próstata y las glándulas bulbouretrales. Se realizaron un total de 100 estímulos eléctricos utilizando un estimulador de corriente alterna a 60-Hz (P.T. Electronics). Los estímulos se realizaron en grupos de 10 para cada nivel de voltaje (rango de 2 - 5 V) con la secuencia total dividida en 4 series (primera serie: 2, 3, 4 V; segunda serie: 3, 4, 5 V; tercera serie: 4, 5 V; cuarta serie: 4, 5 V). El semen se recogió en recipientes de polipropileno estériles (25 ml) precalentados (Lab Center, Madrid, España, catálogo 430130).

El semen obtenido en cada serie de la electroeyaculación se evaluó inmediatamente para registrar el volumen (con una micropipeta) y pH (utilizando tiras reactivas; Medi-Test Combi 9, Machereg-Nagel, Düren, Alemania, catálogo 93023). Se examinó una alícuota (5 µl) de semen empleando óptica de contraste de fases para valorar el % de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento, usando una escala de 0 – 5, donde 0 significa que no hay movimiento y 5 representa un movimiento rápido, lineal y progresivo (Howard *et al.* 1986). Los valores de motilidad se utilizaron para calcular el Índice de Motilidad Espermática (SMI):

$$SMI = \frac{\%móviles + (calidad \times 20)}{2}$$

De cada serie de la electroeyaculación se fijaron alícuotas de semen con una solución de glutaraldehído al 1% en tampón 0,165 M de cacodilato (pH 7,3) y con una solución de paraformaldehído al 4% en una solución tampón de 110 mM Na₂HPO₄ y 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4) que se usaron, respectivamente, para estimar la concentración espermática utilizando una cámara de Neubauer y para preparar frotis que serían teñidos después con Azul de Coomassie (Larson y Miller, 1999) para valorar la morfología espermática y la integridad acrosómica. Para valorar la morfología (Fig. 4.1B) los espermatozoides se clasificaron como se describe en los capítulos 1 - 3. La integridad acrosómica se valoró como en otras especies de felinos (Pukazhenth *et al.* 2006b). Los valores de motilidad y la proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto se utilizaron para calcular un Índice de Motilidad-Calidad-Integridad Acrosómica (MQA) mediante la fórmula:

$$MQA = \frac{\%Móviles + (calidad \times 20) + \%Intactos}{3}$$

El resto del semen se diluyó en igual volumen de medio F-10 de Ham (Irvine Scientific, Izasa, Barcelona, España) tamponado con Hepes y suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (Gibco Invitrogen, Barcelona, España) y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el final de la electroeyaculación. Después los espermatozoides se procesaron para su

criopreservación (ver capítulos 3 y 5) y almacenamiento en un banco de recursos genéticos (Roldan *et al.* 2006a) para su uso futuro.

Recogida de espermatozoides epididimarios

Los espermatozoides se recogieron de machos que habían muerto en el campo, en el área del Parque Nacional de Doñana. Los testículos y los epidídimos se colocaron en una bolsa de plástico y se transportaron en refrigeración a 5°C. En el laboratorio se separaron los epidídimos, se les practicaron unos cortes transversales con una hoja de bisturí, y se dejaron reposar en una placa de Petri (35 x 10 mm Falcon, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Francia) con 0,4 ml de un diluyente de congelación con base Tes - Tris (TEST) (ver tabla 1.1), durante 10 min. Se registró el volumen de suspensión espermática recuperada, medido con una micropipeta, y se transfirió a un microtubo estéril de 1,5 ml. Se valoró la motilidad espermática y se tomaron dos alícuotas, una para la estima de la concentración y la otra para la evaluación de la morfología espermática y la integridad acrosómica; la fijación, tinción y evaluación de los espermatozoides se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente para espermatozoides eyaculados.

Cuantificación de niveles de testosterona y cortisol

Las muestras de sangre se recogieron y centrifugaron para obtención de suero y se almacenaron a -80°C. La testosterona y el cortisol séricos se procesaron en un laboratorio de análisis utilizando un enzimo inmunoensayo competitivo de quimioluminiscencia en fase sólida (Immulite® 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Análisis estadísticos

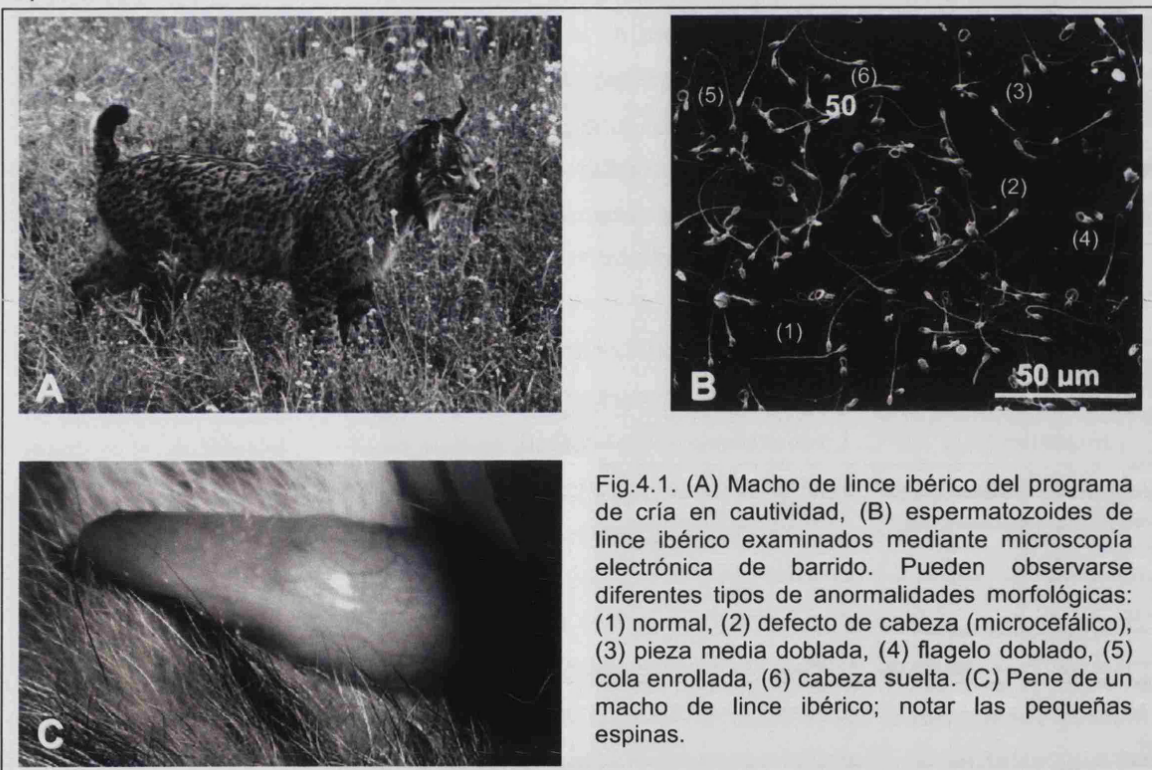
Los datos se analizaron con la versión 11.5 de SPSS. Los resultados se presentan como media±SEM. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para analizar los rasgos fenotípicos y espermáticos, en primer lugar se estudió la independencia y repetibilidad de cada variable (Lessells y Boag 1987). Mediante un ANOVA de una vía hemos analizado la independencia de las muestras procedentes de machos diferentes y de aquéllas de un mismo macho tomadas en años distintos. Como no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas, los eyaculados se consideraron como casos independientes.

Para comparar las variables espermáticas entre grupos de edad en 2007 (menores, iguales y mayores de 3 años) y valorar las diferencias en las características de los machos en el periodo 2005 - 2007 se utilizaron ANOVA de una vía y test *post hoc* de Tukey o Games-Howell (dependiendo de la igualdad o no de varianzas). Para comparar las variables reproductivas recogidas en electroeyaculaciones practicadas en primavera o en invierno, y a

machos de vida libre o cautivos, se usaron test de t de Student. En ambos tipos de análisis, ANOVA y test de t, se exploraron previamente los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Para analizar posibles diferencias entre las fracciones del eyaculado en machos cautivos y en libertad se empleó el test no paramétrico de Friedman para muestras relacionadas. Cuando los resultados fueron significativos se realizaron test no paramétricos de Wilcoxon para muestras relacionadas.

Las relaciones entre rasgos testiculares, hormonales, y seminales y entre estos y los resultados reproductivos en cautividad se analizaron mediante correlación no paramétrica de Spearman.



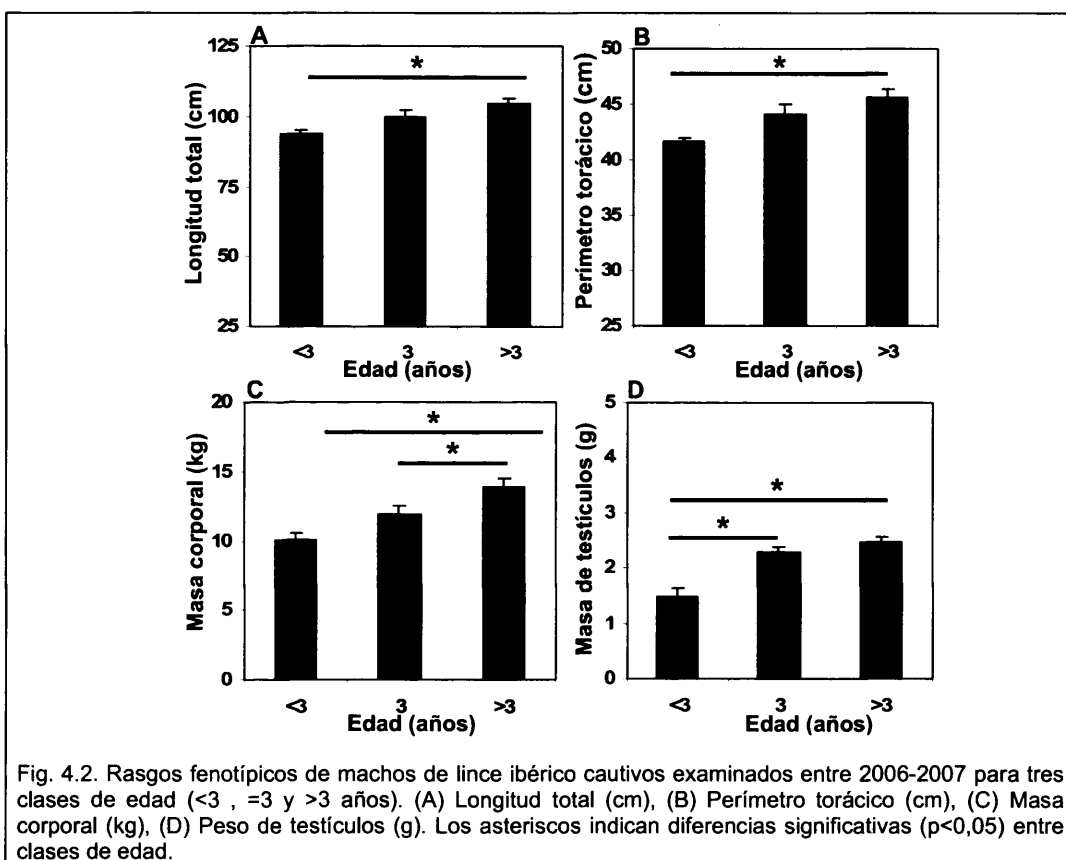
Resultados

Características fenotípicas, endocrinas y seminales en diferentes grupos de edad

Los machos de lince ibérico alcanzan el máximo de medidas corporales superados los 3 años de edad. La longitud de la cabeza ($17,74 \pm 0,29$ cm), la longitud total ($104,71 \pm 1,44$ cm), la altura de la cruz ($46,74 \pm 0,61$ cm) y el perímetro torácico ($45,55 \pm 0,77$ cm) mayores se observan en los machos con más de 3 años y los valores fueron significativamente diferentes de los registrados en machos más jóvenes (<3 años) (Fig. 4.2).

En los machos electroeyaculados en 2007, en los últimos días de Noviembre y los primeros de diciembre, justo antes de la época de cría, los machos >3 años presentaron una

masa corporal ($p=0,040$) y peso de testículos ($p=0,006$) significativamente mayor pero el peso relativo de testículos, sin embargo, fue similar para las tres clases de edad (Tabla 4.1). Los niveles de testosterona y cortisol circulantes también fueron significativamente mayores en los machos ≥ 3 años (Tabla 4.1). El examen del pene reveló la presencia de pequeñas espinas en la región central del pene (Fig. 4.1C), pero éstas no estuvieron presentes en todos los machos.



El volumen eyaculado y la concentración espermática fueron mayores en los machos ≥ 3 años (Tabla 4.1), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. El número total de espermatozoides en el eyaculado fue significativamente mayor en los machos >3 años que en los <3 años. Se encontraron diferencias significativas en el pH del semen entre los machos más jóvenes y los adultos, alcanzando un valor de pH $\sim 7,0$ en los <3 años y de pH $\sim 8,0$ en los >3 años (Tabla 4.1). Los machos >3 años produjeron además semen con una proporción de espermatozoides móviles significativamente mayor que los <3 años. La proporción de espermatozoides morfológicamente normales fue muy superior, aunque no significativamente ($p=0,08$), en los machos >3 años que en los ≤ 3 años (Tabla 4.1). La comparación de las anomalías en diferentes partes del espermatozoide no mostró diferencias significativas entre grupos de edad (Tabla 4.2). Por último, la proporción de

espermatozoides con acrosoma intacto tampoco fue significativamente diferente entre grupos de edad (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Rasgos testiculares, endocrinos y seminales de machos de lince ibérico cautivos de 3 clases de edad, recogidos antes de la época de cría.

	Edad de los machos		
	<3 años (N = 3)	3 años (N = 4)	>3 años (N = 5)
Masa corporal (kg)	9,22±0,17 ^a	11,76±1,08 ^{ab}	12,99±0,68 ^b
Peso de testículos (g)	1,66±0,05 ^a	2,14±0,15 ^b	2,29±0,09 ^b
Peso relativo de testículos (x10 ⁻⁴)	1,80±0,07	1,80±0,29	1,76±0,07
Testosterona (ng/ml)	0,17±0,08 ^a	0,67±0,24 ^{ab}	0,85±0,13 ^b
Cortisol (µg/dl)	7,23±0,57 ^a	18,10±3,53 ^{ab}	21,34±3,79 ^b
Volumen eyaculado (µl)	287,67±78,45	358,50±100,69	327,80±25,76
pH del semen	7,33±0,17 ^a	7,50±0,20 ^{ab}	7,98±0,02 ^b
Concentración espermática (x10 ⁶ esperm./ml)	8,44±5,74	10,29±5,71	28,66±8,40
Número total de espermatozoides (x10 ⁶)	1,81±1,06 ^a	3,54±1,59 ^{ab}	8,84±2,09 ^b
Motilidad (%)	72,85±3,83 ^a	84,11±3,15 ^{ab}	86,84±3,38 ^b
Calidad de la motilidad (escala, 0-5)	2,82±0,34	3,33±0,16	3,25±0,16
Índice de Motilidad Espermática (SMI)	64,59±5,33	75,38±3,08	75,90±3,06
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	26,48±3,59	27,99±5,66	41,72±3,86
Acrosomas intactos (%)	66,86±11,62	65,64±7,85	71,35±5,45
Índice de Motilidad, Calidad y Acrosomas (MQA)	65,35±7,20	72,13±4,28	74,38±2,07

Muestras recogidas en Noviembre - Diciembre de 2007.

Entre columnas (clases de edad), letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

Tabla 4.2. Anormalidades espermáticas en machos de lince ibérico cautivos de 3 clases de edad, en muestras de semen obtenidas antes de la época de cría.

	Edad de los machos		
	<3 años (N = 3)	3 años (N = 4)	>3 años (N = 5)
Espermatozoides morfológicamente anormales (%)	73,52±3,59	72,01±5,66	58,28±3,86
Cabeza	8,30±5,80	7,51±3,67	4,75±1,44
Cabezas sueltas	3,15±0,73	13,21±5,40	7,77±2,07
Pieza media	35,05±8,31	28,31±3,69	27,99±3,09
Pieza principal y terminal	26,99±2,56	20,63±2,89	17,01±1,99
Con gota citoplasmática	17,05±5,86	9,54±2,45	17,34±2,67

Muestras recogidas en Noviembre - Diciembre de 2007.

Características testiculares, endocrinas y seminales en animales cautivos y de vida libre

Se han examinado posibles diferencias en los rasgos reproductivos entre animales cautivos y de vida libre en los machos electroeyaculados en 2006. No hubo diferencias significativas entre los machos en los dos ambientes con la excepción de un menor ($p=0,04$) porcentaje de espermatozoides móviles en los machos que vivían en libertad ($58,32\pm6,30\%$) con respecto a los machos cautivos ($77,85\pm4,95\%$) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Rasgos testiculares, endocrinos y seminales de lince ibérico en diferentes años. Machos ≥ 3 años.

	2005		2006	2007
	Cautivos (N = 3)	Libres (N = 4)	Cautivos (N = 5)	Cautivos (N = 9)
Edad (años)	5,00 \pm 1,00	7,00 \pm 1,78	4,80 \pm 0,92	4,56 \pm 0,69
Masa corporal (kg)	12,85 \pm 1,05	14,35 \pm 0,80	13,68 \pm 0,73	12,37 \pm 0,63
Peso de testículos (g)	2,40 \pm 0,15 ^{ab}	3,03 \pm 0,38	2,65 \pm 0,14 ^a	2,23 \pm 0,08 ^b
Peso relativo de testículos ($\times 10^{-4}$)	1,87 \pm 0,07	2,13 \pm 0,27	1,95 \pm 0,12	1,78 \pm 0,12
Testosterona (ng/ml)	0,70 \pm 0,08	1,17 \pm 0,40	0,84 \pm 0,15	0,77 \pm 0,12
Cortisol (μ g/dl)	16,95 \pm 1,35	10,80 \pm 0,82	13,32 \pm 1,64	19,90 \pm 2,53
Volumen eyaculado (μ l)	564,67 \pm 72,13	470,25 \pm 83,36	436,20 \pm 106,63	341,44 \pm 43,63
pH seminal	7,93 \pm 0,07	7,45 \pm 0,26	7,54 \pm 0,10	7,77 \pm 0,12
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	4,69 \pm 0,63	10,13 \pm 4,06	8,04 \pm 2,12	20,49 \pm 5,95
Nº total de espermatozoides ($\times 10^6$)	2,73 \pm 0,66	5,27 \pm 2,76	3,48 \pm 1,33	6,48 \pm 1,58
Motilidad (%)	78,83 \pm 5,74	58,32 \pm 6,30 (*)	77,85 \pm 4,95 (*)	85,63 \pm 2,25
Calidad de la motilidad (escala, 0-5)	3,06 \pm 0,11	2,67 \pm 0,32	3,72 \pm 0,53	3,29 \pm 0,11
Índice de la Motilidad Espermática (SMI)	70,01 \pm 3,95	55,81 \pm 5,83	76,10 \pm 7,29	75,67 \pm 2,04
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	24,70 \pm 6,35	25,91 \pm 5,95	31,31 \pm 5,07	35,62 \pm 3,91
Acrosomas intactos (%)	39,72 \pm 3,09 ^a	49,59 \pm 9,53	44,45 \pm 6,92 ^a	68,81 \pm 4,42 ^b
Índice de Motilidad, Calidad y Acrosomas (MQA)	59,92 \pm 2,72	53,73 \pm 6,72	65,55 \pm 6,02	73,38 \pm 2,10

Muestras recogidas en Noviembre - Diciembre de 2007.

Los parámetros seminales son la media para el eyaculado completo.

Entre años, letras diferentes indican diferencias significativas en machos cautivos ($p < 0,05$).

Entre machos cautivos y en libertad (año 2006), los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Rasgos testiculares, endocrinos y seminales después de la época reproductiva

Los datos fenotípicos y espermáticos recogidos entre febrero y Abril, al final de la época de cría, se presentan en la Tabla 4.4. La comparación de parámetros de estos eyaculados y los recogidos entre Noviembre y diciembre (antes de la época de cría) (Tablas 4.1 y 4.3) no reveló diferencias significativas.

Tabla 4.4. Características seminales del lince ibérico después de la época de cría

	Media \pm SEM (N=3)
Edad (años)	3,33 \pm 0,88
Masa corporal (kg)	12,20 \pm 2,25
Peso de testículos (g)	2,21 \pm 0,21
Peso relativo de testículos ($\times 10^{-4}$)	1,93 \pm 0,42
Testosterona (ng/ml)	0,57 \pm 0,25
Cortisol (μ g/dl)	18,40 \pm 4,60
Volumen eyaculado (μ l)	660,67 \pm 178,23
pH seminal	7,70 \pm 0,21
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	20,69 \pm 7,41
Nº total de espermatozoides ($\times 10^6$)	15,16 \pm 6,76
Motilidad (%)	62,11 \pm 14,32
Calidad de la motilidad (escala, 0-5)	2,83 \pm 0,12
Índice de la Motilidad Espermática (SMI)	59,39 \pm 8,15
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	20,07 \pm 1,84
Acrosomas intactos (%)	33,15 \pm 1,24
Índice de Motilidad, Calidad y Acrosomas (MQA)	50,64 \pm 5,75

Muestras recogidas en Febrero - Abril de 2005.

Fracciones seminales

Se compararon las características espermáticas de cada una de las cuatro fracciones recogidas durante el protocolo de electroeyaculación de los machos mayores de 3 años. Se encontraron diferencias significativas entre series en el número total de espermatozoides, siendo mayor en la primera serie ($4,06 \pm 1,51 \times 10^6$ espermatozoides) que en las otras tres series de la electroeyaculación ($1,01 \pm 0,26$, $0,50 \pm 0,15$ y $0,31 \pm 0,16 \times 10^6$ espermatozoides en la segunda, tercera y cuarta serie, respectivamente; $p=0,03$ en todos los casos) (Fig. 4.3).

En machos de vida libre de >3 años, aunque el número de espermatozoides fue ligeramente mayor en la primera fracción, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los caracteres espermáticos estudiados (no se muestran los datos).

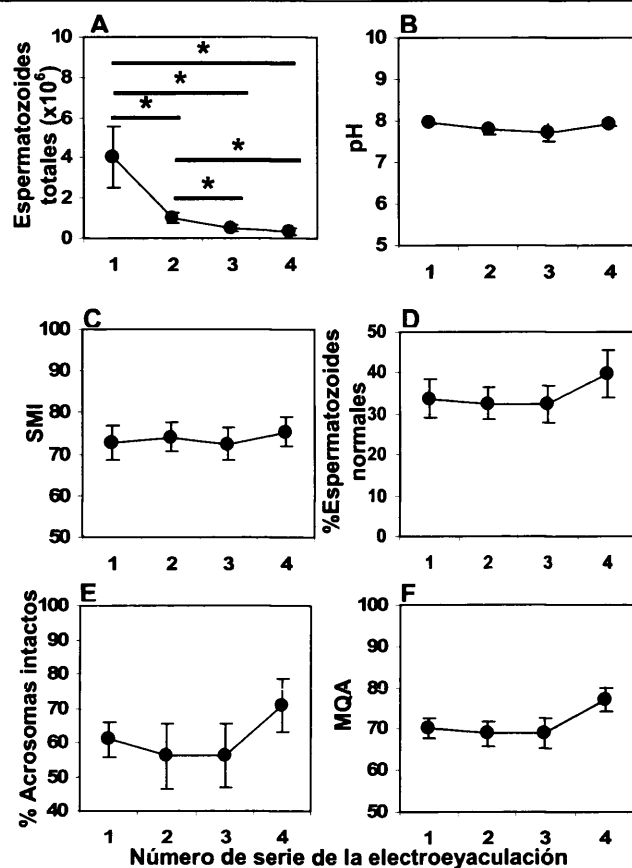


Fig 4.3. Parámetros espermáticos de las cuatro fracciones de la electroeyaculación recogidas de machos cautivos de lince ibérico con más de 3 años de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre fracciones (series).

Relación entre características seminales

Se han examinado las posibles relaciones entre características espermáticas y fenotípicas en machos ≥ 3 años. Se encontró relación significativa entre el nivel de testosterona en suero y el volumen eyaculado ($p < 0,05$) y también entre el peso de testículos y el volumen eyaculado ($p < 0,01$). No se encontró asociación significativa entre el peso relativo de testículos, o la testosterona, con los parámetros espermáticos. Hubo relación significativa entre el pH del semen y el % de espermatozoides normales ($p < 0,05$), y con el % de acrosomas intactos ($p = 0,05$). No se encontró asociación entre el número total de espermatozoides y el % de espermatozoides normales. Sí se observó relación significativa entre el % de espermatozoides móviles y la calidad de la motilidad ($p < 0,01$). Además, el % de espermatozoides móviles correlacionó significativamente con el % de acrosomas intactos ($p < 0,05$). Por último, hubo correlación significativa entre el % de espermatozoides normales y el % de acrosomas intactos ($p < 0,01$) o el índice MQA ($p < 0,01$).

Espermatozoides epididimarios

Se intentó recuperar espermatozoides *post mortem* de seis machos que habían muerto por diferentes causas en poblaciones naturales. Los testículos y los epidídimos (normalmente uno de cada macho) se recuperaron y examinaron entre marzo de 2005 y Abril de 2008. El peso de testículos y los parámetros espermáticos se ajustaron para dos testículos. Se pudieron recuperar espermatozoides epididimarios de cuatro machos (Tabla 4.5). Hemos observado considerables diferencias entre machos, principalmente en relación al número total de espermatozoides (rango: 0,55 – 31,15 x 10⁶ espermatozoides) y la proporción de espermatozoides normales (rango: 17 - 54%). En dos casos (FM 1 y FM3) se pudieron evaluar todos los parámetros espermáticos excepto la motilidad, debido a que cuando las muestras llegaron al laboratorio los espermatozoides la habían perdido (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Características testiculares y de los espermatozoides epididimarios frescos de lince ibérico recuperados *post mortem*.

	Macho				Media ±SEM
	FM1	FM2	FM3	FM4	
Fecha de muerte	14/03/05	17/04/06	14/03/07	18/03/07	
Edad (años)	2	3	4	11	5,00±2,04
Causa de muerte	Atropello	Atropello	Infección	Infección	
Masa corporal (kg)	11,00	n.d.	12,35	8,26	9,17± 1,61
Peso de testículos (g)	5,14	5,92	6,11	4,70	5,36±0,28
Peso relativo de testículos (x10 ⁻⁴)	4,67	n.d.	4,95	5,69	5,09± 0,31
Número total de espermatozoides (x10 ⁶)	7,31	31,15	0,55	1,96	10,24±1,78
Motilidad (%)	0	45	0	50	47,5±2,5
Calidad de la motilidad (escala, 0-5)	0	2	0	2,5	2,25±0,25
Índice de la Motilidad Espermática (SMI)	0	42,50	0	50,0	46,25±3,75
Espermatozoides viables (%)	48	68	23	n.d.	46,42±13,09
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	38	54	17	18	31,75±5,92
Acrosomas intactos (%)	32	32	44	46	38,50±3,79
Espermatozoides sin gota citoplasmática (%)	67	94	95	72	82,00±7,47

Muestras recogidas en Febrero - Abril de 2005.
n.d., sin determinar.

Los parámetros espermáticos promedio para espermatozoides epididimarios fueron similares a los observados para espermatozoides eyaculados obtenidos de machos de vida libre de la población de Doñana. Estos dos grupos (machos de vida libre evaluados *in vivo* y *post mortem*) difieren en el peso absoluto y relativo de testículos, que fueron mayores en las muestras recogidas *post mortem* (comparar las Tablas 4.3 y 4.5).

Relaciones entre parámetros seminales y fertilidad del macho

Se han analizado los resultados de fertilidad de diferentes machos en cautividad en el periodo 2006 - 2008 y se han comparado estos datos con las características seminales de estos machos, que fueron valoradas a partir de la muestra tomada en una electroeyaculación que se le practicó aproximadamente un mes antes del inicio de la época de cría. Se consideraron solo los apareamientos entre hembras y machos ≥ 3 años de edad. En una época de cría dada, en algunos casos, un mismo macho se emparejó con 2 hembras de forma sucesiva, con un tiempo de descanso entre ambas.

Hubo correlación significativa entre el peso relativo de testículos de los machos y el número medio de cópulas por hembra ($p=0,02$), así como con el número medio de cópulas con la primera hembra cuando un macho se emparejó 2 veces ($p=0,01$) (Fig. 4.1A). Además se observó correlación significativa entre el número total de espermatozoides en el eyaculado y el número de cópulas con la primera hembra con la que se apareó ($p=0,03$) (Fig. 4.1B). Las características del semen también se relacionaron con el número de cachorros/hembra, como se puso en evidencia al comparar las hembras que parieron 2 y 3 cachorros, respectivamente (Figs 4.1C,D), de forma que los machos que dieron lugar a mayor número de cachorros produjeron un número de significativamente mayor espermatozoides en el eyaculado ($p=0,05$) (Fig. 4.1C), una mayor motilidad (revelada por el SMI) ($p<0,05$) (Fig. 4.1D) y una mayor proporción de espermatozoides con acrosoma intacto en el eyaculado ($p=0,01$).

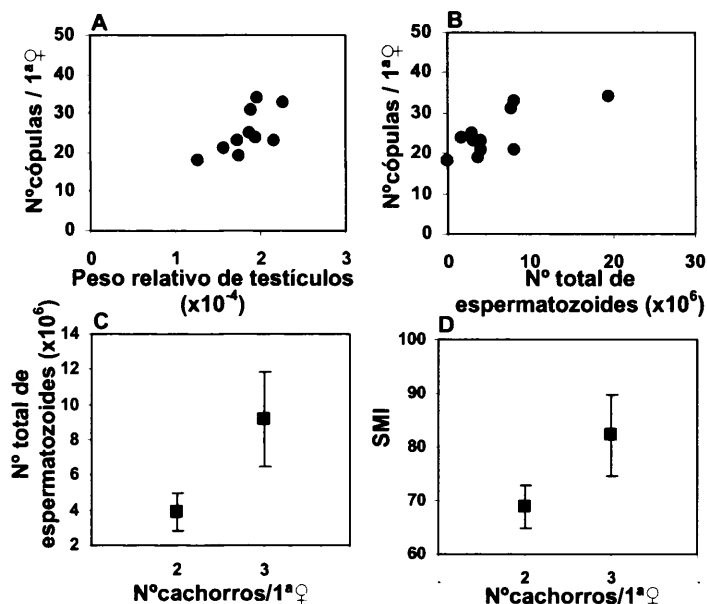


Fig. 4.4. Relación entre características fenotípicas y seminales de lince ibérico cautivos y su fertilidad. (N=12), (A) Peso relativo de testículos ($\times 10^{-4}$) y Nº de cópulas/1ª hembra; $p=0,01$, (B) Nº total de espermatozoides ($\times 10^6$) y Nº cópulas/1ª hembra; $p=0,03$, (C) Diferencias en número total de espermatozoides ($\times 10^6$) cuando la 1ª hembra parió 2 ó 3 cachorros; $p=0,05$, (D) Diferencias en SMI cuando la 1ª hembra parió 2 o 3 cachorros; $p=0,001$.

Discusión

Este estudio ha permitido valorar por primera vez los rasgos fenotípicos, endocrinos y seminales de lince ibérico cautivos y en libertad. Los resultados obtenidos han revelado diferencias relacionadas con la edad del macho, pero no mayores diferencias entre individuos cautivos o en libertad, ni entre espermatozoides eyaculados de animales vivos o epididimarios de animales muertos. Además, hemos descubierto asociación significativa entre parámetros del eyaculado como el % de acrosomas intactos con el % de espermatozoides móviles y el % de espermatozoides normales, y de rasgos fenotípicos o seminales con la fertilidad de los machos del programa de cría en cautividad.

El peso de testículos ($2,52 \pm 0,10$ g) en el lince ibérico y, consecuentemente, el peso relativo de testículos (índice gonadosomático) ($1,89 \pm 0,08 \times 10^{-4}$) son muy pequeños en comparación con otras especies de mamíferos (Kenagy y Trombulak 1986, França y Godinho 2003). Además, los pesos absoluto y relativo de testículos del lince ibérico son bajos en comparación con los de otras especies de felinos con similar masa corporal, tales como el caracal (peso de testículos hasta 10,00 g e índice gonadosomático hasta $5,00 \times 10^{-4}$; Bernard y Stuart 1987), el gato pescador (*Prionailurus viverrinus*) (peso de testículos: $6,05 \pm 0,55$ g e índice gonadosomático: $5,00 \times 10^{-4}$; Thiangtum *et al.* 2006) o el ocelote (peso de testículos hasta $65,21 \pm 7,59$ g e índice gonadosomático hasta $57,25 \times 10^{-4}$; Stoops *et al.* 2007). El lince ibérico

tiene una masa de testículos que es incluso más pequeña que la observada en felinos salvajes de menor tamaño corporal tales como la tigrina (peso de testículos: $4,62 \pm 0,22$ g; índice gonadosomático: $15,40 \times 10^{-4}$; *Morais et al.* 2002) o el margay (peso de testículos: $6,82 \pm 0,22$ g; índice gonadosomático: $20,06 \times 10^{-4}$; *Morais et al.* 2002) con una masa corporal cuatro veces menor, o el gato de Pallas (peso de testículos: $2,20 \pm 0,22$ g e índice gonadosomático: $4,02 \times 10^{-4}$; *Swanson et al.* 1996a) con una masa corporal 2 - 3 veces más pequeña. Por otra parte, los rasgos testiculares en el lince ibérico son similares a los vistos en lince euroasiático (peso de testículos máximo 3,19 g; *Jewgenow et al.* 2006) y lince rojo (peso de testículos hasta 2,14 g; índice gonadosomático hasta $2,05 \times 10^{-4}$; capítulo 3). El peso relativo de testículos es un buen indicador del nivel de competencia espermática de una especie (*Gomendio et al.* 1998), lo que parece indicar que en las especies de lince en libertad las hembras no suelen copular con varios machos. Otra posible explicación no excluyente es la baja variabilidad genética de la especie (*Johnson et al.* 2004). Debería tenerse en cuenta que los machos se examinaron alrededor de un mes antes de la época de cría de forma que es posible que los valores de masa testicular registrados puedan no corresponderse con los valores máximos alcanzados en el pico la época de cría. En cualquier caso, el hecho de que presenten similar peso absoluto y relativo de testículos después de la época de cría, y similar al de otras especies de lince, sugiere que la estacionalidad no sea una explicación para el reducido tamaño testicular. También parece improbable que la disponibilidad de alimento o el estrés de cautividad puedan explicar este carácter, dado que no se han encontrado diferencias entre machos libres y cautivos. A la vista de los resultados se hacen necesarios más estudios encaminados al análisis de efecto de la variabilidad genética en el tamaño de testículos así como en la calidad seminal.

La presencia de espinas queratinizadas en el pene se cree que es un rasgo especie-específico y adaptativo (*Swanson et al.* 2003). En el lince ibérico la ausencia de espinas en algunos machos, o la presencia de algunas muy pequeñas en otros, podría estar relacionada con los bajos niveles de testosterona encontrados (*Aronson y Cooper* 1967), aunque no tenemos evidencia suficiente para concluir que ambos caracteres estén relacionados o no. Las espinas pueden desarrollarse más justo antes de que las hembras se muestren en estro, junto a un incremento del nivel de testosterona en sangre en el pico de la época reproductiva, tal como se ha descrito en el gato de Pallas (*Brown et al.* 2002). No obstante es posible que las espinas no se desarrollen en respuesta a un incremento de la testosterona como se ha observado que ocurre en jaguares cautivos (*Morato et al.* 2004), o simplemente que la presencia y tamaño de la espinas no esté relacionado con la testosterona circulante (*Swanson et al.* 2003). Para poder dilucidar entre estas alternativas son necesarios estudios que examinen a los machos de lince ibérico en el pico de la época de cría.

El número total de espermatozoides recogido a partir de machos adultos de lince ibérico electroeyaculados (promedio $5,56 \times 10^6$ espermatozoides) fue menor que el registrado para otros felinos de mediano tamaño (ver capítulo 5), incluidas otras especies de lince como el lince rojo ($10,01 \times 10^6$ espermatozoides; capítulo 3) pero mayor que el descrito para el lince euroasiático, con $1,6 - 2,9 \times 10^6$ espermatozoides totales por eyaculado (Jewgenow *et al.* 2006). Estos resultados concuerdan con las diferencias en peso de testículos que existen entre estas especies (ver más arriba).

El porcentaje de espermatozoides móviles (promedio $77,05 \pm 2,85\%$) y de espermatozoides con acrosoma intacto ($54,28 \pm 3,89\%$) fue, en general, más bajo que el observado en otros felinos de mediano tamaño como el ocelote, el caracal, el serval o el gato pescador (Howard 1993, Pukazhenth *et al.* 2002, Thiangtum *et al.* 2006, Stoops *et al.* 2007) pero más alto que los registrados en lince euroasiático (30% de espermatozoides móviles antes de la época de cría o lince rojo ($55,71 \pm 5,76\%$ de espermatozoides móviles; capítulo 3).

La proporción de espermatozoides normales por eyaculado varía ampliamente entre las especies de felinos (Pukazhenth *et al.* 2006c), pero la teratospermia (presencia de más del 60% de espermatozoides morfológicamente anormales en el eyaculado) tiene una alta prevalencia en esta familia. Los machos de lince ibérico producen, en promedio, una baja proporción de espermatozoides morfológicamente normales ($30,62 \pm 2,48\%$), en comparación con especies predominantemente normospermicas como el ocelote (Baudi *et al.* 2008) o el serval (Pukazhenth *et al.* 2002), pero estos valores son similares a los registrados para lince euroasiático ($28,7 \pm 13,0\%$, Howard 1993; 26%, Jewgenow *et al.* 2006) y mayores que los observados en el lince rojo ($14,67 \pm 2,07\%$; capítulo 3) o en especies con niveles extremos de teratospermia como el guepardo (12% espermatozoides normales; Roth *et al.* 1995), la pantera de Florida (6% espermatozoides normales; Barone *et al.* 1994) o la pantera nebulosa (<20% espermatozoides normales; Wildt *et al.* 1986a, Pukazhenth *et al.* 2006b). Por otra parte, Neubauer y colaboradores (2004) afirman que el incremento del porcentaje de espermatozoides anormales en el eyaculado está asociado con un incremento en la producción de espermatozoides en gatos teratospermicos (Neubauer *et al.* 2004). Hemos explorado la potencial relación entre el número total de espermatozoides y el % de espermatozoides anormales en el lince ibérico y no hemos encontrado asociación significativa entre estos parámetros.

El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (promedio $54,28 \pm 3,89\%$) fue bajo en comparación con los valores vistos en ocelote, gato pescador o gato de Pallas (Baudi *et al.* 2008, Thiangtum *et al.* 2006, Swanson *et al.* 2006), pero ligeramente superior al observado en lince rojo ($43,7 \pm 3,8\%$; capítulo 3).

Las características seminales, especialmente el bajo porcentaje de espermatozoides normales y el bajo nivel de testosterona circulante, pueden estar relacionados con los bajos

niveles de variabilidad genética de esta especie, que son de los más bajos documentados en felinos (Johnson *et al.* 2004). Estudios previos han encontrado relación entre una reducida variabilidad genética y una merma en los valores alcanzados por parámetros reproductivos en felinos salvajes como el guepardo (Wildt *et al.* 1983, 1987b, Roth *et al.* 1995), el león (*Panthera leo*; Wildt *et al.* 1987a) y la pantera de Florida (Barone *et al.* 1994). Deberían plantearse estudios en el futuro orientados a estudiar si este es también el caso del lince ibérico y además si los diferentes niveles de variabilidad genética existentes en las dos poblaciones aisladas (Johnson *et al.* 2004) afectan de forma diferente a las características fenotípicas y la calidad seminal.

El análisis de los resultados de parámetros seminales sugiere que los machos de lince ibérico no alcanzan la madurez sexual plena hasta que superan los 3 años de edad. Los machos de 1 - 2 años comienzan a producir espermatozoides y presentan diferencias significativas en parámetros fenotípicos, endocrinos y seminales con los machos de más de 3 años; incluso difieren significativamente de los machos de 3 años en el peso de testículos. Los machos de 3 años presentan, por una parte, valores mayores en todos los parámetros seminales, endocrinos y fenotípicos evaluados que los animales más jóvenes y, por otra, valores menores en la mayoría de parámetros evaluados que los machos de más de 3 años, aunque las diferencias en ambos casos no llegan a ser estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias entre las características reproductivas de los machos antes y después de la época de cría, definiendo ésta en base a la receptividad de las hembras. No hemos examinado los machos en el pico de la época de cría para evitar las perturbaciones que esto les pudiese generar en la época crítica para el programa de cría en cautividad. Es posible que aunque las hembras de esta especie presentan un periodo de receptividad muy restringido, los machos continúen produciendo espermatozoides hasta más avanzado el año. Futuros estudios deberían explorar esta posibilidad.

Se detectaron diferencias en el peso absoluto y relativo de testículos entre las medidas tomadas *in vivo* y las tomadas *post mortem*. El valor más alto identificado en testículos recogidos y transportados al laboratorio podría deberse a la eliminación del escroto y la túnica albugínea, que comprimen los testículos y, en consecuencia, las medidas resultan menores que las tomadas a partir de animales vivos. Por otra parte, existen algunas particularidades en algunos de los machos examinados *post mortem* que podrían estar afectando a los resultados, por lo que deben ser señaladas. El macho FM4 era senescente (11 años de edad) y mostraba caquexia y deshidratación severa que habían reducido su masa corporal. En segundo lugar el macho FM1 presentaba bajas masas corporales y testiculares debido a su corta edad (2 años).

No hubo grandes diferencias en los parámetros espermáticos de machos cautivos y en libertad, lo cual es consistente con resultados obtenidos para guepardo (Wildt *et al.* 1987b, Crosier *et al.* 2007) y no sorprende dado que la mayoría de los animales del programa de cría

en cautividad del lince ibérico han sido trasladados a cautividad recientemente, reciben una dieta equilibrada y se encuentran en instalaciones de gran tamaño provistas de vegetación autóctona que las dota de características muy parecidas al hábitat natural de la especie. Los resultados contrastan con los vistos en el jaguar, en el cual los machos de vida libre producen mayor número de espermatozoides y con una proporción mayor de espermatozoides morfológicamente normales que los machos mantenidos en zoológicos (Morato *et al.* 2001), quizás como resultado de unas condiciones pobres de cautiverio.

El análisis conjunto de los resultados de parámetros seminales y fertilidad sugiere también que los machos de lince ibérico no alcanzan la madurez sexual plena hasta que superan los 3 años de edad, aunque los machos de entre 2 y 3 años son capaces de fecundar hembras de ≥ 3 años de edad. De forma similar, las hembras no alcanzan la madurez sexual plena hasta los 3 años. Un 71,43% de las hembras de 3 años de edad quedaron preñadas mientras que ninguna hembra de 2 años ha quedado preñada si no se ha apareado con un macho maduro.

Se han encontrado asociaciones claras entre caracteres fenotípicos (peso relativo de testículos) o parámetros espermáticos (número total de espermatozoides, motilidad, integridad acrosómica) y la fertilidad de los machos. El peso relativo de testículos y el número de espermatozoides muestran una relación significativa con el número de cópulas, mientras que el número de espermatozoides, la motilidad y la integridad acrosómica están asociadas con el número de cachorros. Estos resultados son importantes porque nos permitirán evaluar en el futuro el potencial reproductivo de los machos del programa de cría en cautividad antes de la época de cría. Se ha dado en el pasado bastante dificultad para establecer lazos claros entre parámetros espermáticos y fertilidad masculina en felinos, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que el número de machos cautivos fuese pequeño y que además estuviesen dispersos por varios zoos. En ungulados salvajes, en los que se pudo examinar un mayor número de animales, se han revelado asociaciones claras entre parámetros espermáticos y fertilidad masculina (Malo *et al.* 2005, Gomendio *et al.* 2007).

En resumen, nuestro estudio reveló que en el lince ibérico, (a) es posible recoger semen de animales que viven en libertad, (b) los machos alcanzan la madurez sexual plena cuando superan los 3 años de edad, (c) algunas características seminales pueden variar entre años, (d) no hay diferencias importantes en cuanto a parámetros espermáticos entre animales cautivos y de vida libre, (e) no hay diferencias entre muestras de semen recogidas alrededor de un mes antes de la época de apareamientos, o justo después de este momento, (f) es posible recuperar espermatozoides epididimarios viables de animales muertos, y (g) varias características fenotípicas y seminales correlacionan con el comportamiento reproductivo y la fertilidad masculinos.

Capítulo 5

Calidad del semen, criopreservación de espermatozoides y fecundación *in vitro* heteróloga en el lince ibérico (*Lynx pardinus*)



Resumen

Se han examinado los parámetros seminales y los factores que afectan a la criopreservación espermática en el lince ibérico (*Lynx pardinus*), considerado el felino más amenazado del planeta. Para la criopreservación el semen se lavó mediante centrifugación, se resuspendió en TEST o Biladyl, ambos con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol, se cargó en pajuelas, se refrigeró hasta 5°C con un sistema automático programable y congeladas sobre vapores de nitrógeno. Se ha usado fecundación *in vitro* heteróloga con oocitos de gato doméstico madurados *in vitro* para valorar la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados. Se obtuvo semen mediante electroeyaculación de 5 machos, con (media±SEM) $3,3 \pm 0,6 \times 10^6$ espermatozoides totales, 73,6±4,6% de espermatozoides móviles, 23,7±4,0% de espermatozoides morfológicamente normales y 40,7±2,3% de espermatozoides con acrosoma íntegro. Después la descongelación se obtuvo mayor porcentaje de espermatozoides móviles en las muestras congeladas en TEST (34,0±6,2%) que en las congeladas en Biladyl (7,5±4,8%) ($p < 0,05$). No se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos entre diluyentes. Los espermatozoides criopreservados de lince ibérico fueron capaces de fecundar *in vitro* oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*. Se obtuvieron tasas de fecundación más altas con espermatozoides criopreservados en TEST (20,5±4,5%) que con los criopreservados en Biladyl (11,5±6,8%), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. El análisis de parámetros seminales y las tasas de fecundación ha mostrado una relación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto antes de la congelación y el éxito de la fecundación heteróloga ($p = 0,04$). Este es el primer estudio sobre criopreservación de semen de lince ibérico y análisis de potencial fecundante que permitirá avanzar en el desarrollo de biotecnologías reproductivas en esta especie de felino críticamente amenazada.

Introducción

El lince ibérico se considera el felino más amenazado del mundo y el carnívoro más amenazado de Europa (Nowell y Jackson 1996). La especie está incluida como “críticamente amenazada” en la Lista Roja de la IUCN (IUCN 2008). No se ha extinguido ninguna especie de felino salvaje desde hace varios miles de años (Swanson *et al.* 2007). Si el lince ibérico se extinguiera, sería la primera especie en hacerlo desde entonces.

El lince ibérico es endémico de la península Ibérica y hasta hace 100 años se distribuía por toda ella (Rodríguez y Delibes 2003, Rodríguez 2007). En el presente el tamaño de población en libertad es de aproximadamente 200 individuos que están confinados al sur de España, distribuidos en dos poblaciones reproductivamente viables y aisladas, con niveles diferentes de variabilidad genética (Johnson *et al.* 2004), una en Doñana y la otra en las sierras de Andújar y Cardeña en Sierra Morena oriental (Blanco 1998, Rodríguez y Delibes 2003, Rodríguez 2007).

Durante décadas se ha realizado mucho trabajo centrado en la ecología y la conservación *in situ* de esta especie. Las medidas de conservación *ex situ* se iniciaron en 2003 con la puesta en marcha del Programa de Conservación *Ex Situ* del lince ibérico mediante el establecimiento de un Memorandum de Acuerdo entre el Ministerio de Medio Ambiente de España y la Junta de Andalucía. Este programa utiliza el Plan de Acción para la cría en cautividad del lince ibérico como mapa de ruta (Vargas *et al.* 2007). Uno de sus principales objetivos de este programa consiste en criar lince ibéricos en cautividad para conservar el 85% de la variabilidad genética existente al comienzo de la cría en cautividad y mantenerla en la naturaleza por un periodo de 30 años. Para alcanzar este objetivo se decidió que se mantendría en cautividad un stock de 60 - 70 lince ibéricos (32 fundadores más los individuos nacidos en el programa de cría en cautividad) (Vargas *et al.* 2008) antes de que se intenten las reintroducciones en o después de 2010.

La conservación del lince ibérico, usando las aproximaciones *in situ* y *ex situ*, puede beneficiarse de una serie de técnicas de reproducción asistida (ARTs) (Wildt 1990, Pukazhenthi y Wildt 2004, Pope *et al.* 2006a,b, Pukazhenthi *et al.* 2006a, Swanson 2006). En particular, la recolección, preservación y uso de espermatozoides será importante para el establecimiento de un banco de recursos genéticos y, en combinación con otras técnicas como la inseminación artificial, maduración de oocitos *in vitro*, fecundación, cultivo y transferencia de embriones, permitiría el flujo genético entre poblaciones separadas, incluyendo el enlace entre poblaciones *in situ* y *ex situ*, sin tener que extraer animales de la naturaleza o desplazar animales cautivos (Pukazhethi *et al.* 2006a, Swanson *et al.* 2007). La viabilidad de estas aproximación se ha demostrado en guepardo usando espermatozoides congelados-descongelados recogidos de machos salvajes en Namibia para inseminación artificial que ha culminado en el nacimiento de cachorros vivos en zoos

de Norteamérica (Wildt *et al.* 1997) y se está desarrollando actualmente en otras especies de felinos (Swanson *et al.* 2007).

Hay diversos estudios que tratan sobre la recogida, caracterización y criopreservación de espermatozoides en felinos. Se han examinado métodos para la criopreservación de espermatozoides de especies salvajes pero son necesarios todavía estudios básicos de criobiología básicos para muchas especies (Leibo y Songsasen 2002). La criopreservación es letal para una alta proporción (alrededor del 50%) de espermatozoides en cualquier muestra de semen (Watson 2000). En general, los espermatozoides descongelados presentan además un alto porcentaje de membranas acrosómicas dañadas (Swanson y Wildt 1997). Se ha demostrado que los espermatozoides de las distintas especies varían considerablemente en criosensibilidad, y que estas diferencias se dan también entre individuos de una misma especie (Yu *et al.* 2002), y por ello se hace necesario ajustar los protocolos de criopreservación a cada especie. Estudios con gato doméstico han usado criodiluyentes basados en Tris-ácido cítrico o Tes - Tris (TEST) con resultados variables. Esto es, algunos estudios han registrado mejor tasa de supervivencia a la congelación con los de base Tris y otros con los basados Tes (Luvoni 2006). No hay experiencias previas en la criopreservación de espermatozoides de lince ibérico.

La preparación de las muestras para su criopreservación implica la dilución en medio de cultivo (por ejemplo F-10 de Ham) y una centrifugación posterior (Pukazhenthii *et al.* 2002; Swanson *et al.* 2006; Thiangtum *et al.* 2006; Stoops *et al.* 2007). La evaluación de la supervivencia espermática se hace mediante incubaciones de espermatozoides frescos o criopreservados en medio de cultivo con suero fetal bovino, examinando la motilidad y la integridad acrosómica a lo largo del tiempo (Thiangtum *et al.* 2006); esto puede servir como indicación de la supervivencia espermática durante el cocultivo de gametos durante la fecundación *in vitro* (IVF) o después de una inseminación artificial. En algunas especies como la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), se prefiere el suero homólogo en lugar del suero fetal bovino (Pukazhenthii *et al.* 2002). Dado que la supervivencia durante la incubación puede ser pobre en algunas especies, es necesario explorar medios de cultivo alternativos o suero homólogo.

En el laboratorio se pueden analizar varios parámetros espermáticos para la evaluación de la calidad del semen, pero estos aportan solo una limitada estima de la funcionalidad espermática. Por otra parte, la fecundación *in vitro* (IVF) proporciona un test muy útil de la funcionalidad pero la recogida de oocitos de especies amenazadas muchas veces no es posible. Los oocitos de gata doméstica se encuentran disponibles con cierta facilidad y pueden resultar útiles para valorar la funcionalidad de espermatozoides de lince ibérico, permitiendo examinar si son capaces de interactuar con y penetrar los oocitos de

gata doméstica, como se ha visto en otras especies de felinos no domésticos (gato de Bengala (*Felis bengalensis*): Howard y Wildt 1990, Andrews et al. 1992; tigre (*Panthera tigris*): Donoghue et al. 1992b; guepardo (*Acinonyx jubatus*): Donoghue et al. 1992a, Roth et al. 1995; pantera de las nieves (*Panthera uncia*): Roth et al. 1994; gato pescador (*Prionailurus viverrinus*): Thiangtum et al. 2006; gato de Pallas (*Otocolobus manul*): Swanson et al. 2006; ocelote (*Leopardus pardalis*): Stoops et al. 2007).

Los objetivos de este estudio fueron (a) caracterizar los parámetros seminales del lince ibérico, (b) analizar la capacidad de los espermatozoides de lince ibérico de sobrevivir en varias condiciones de incubación *in vitro*, (c) valorar métodos de criopreservación, evaluando el efecto sobre la motilidad y la integridad acrosómica, y (d) evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides criopreservados de lince ibérico usando fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico.

Materiales y métodos

Animales

Cinco machos de lince ibérico (3 - 6 años de edad), mantenidos en el Centro de Cría de Lince Ibérico "El Acebuche" (Parque Nacional de Doñana, Huelva, España), se electroeyacularon bajo anestesia general justo antes de la época de cría de los años 2005 y 2006. La época de cría abarca de diciembre a febrero, ocurriendo la mayoría de los apareamientos en enero. Todos los machos procedían de la naturaleza y, tras el conveniente periodo de cuarentena fueron mantenidos en condiciones seminaturales en instalaciones individuales de 550 m² en contacto visual, olfativo y auditivo con machos y hembras de la misma especie. Las instalaciones están provistas de vegetación mediterránea natural. De los 5 machos utilizados en este estudio, uno había mostrado fertilidad con anterioridad y otros 3 la mostraron posteriormente.

Recogida y evaluación de espermatozoides

La recogida de semen (una por cada macho) se realizó bajo anestesia, mediante inyección intramuscular de tiletamina-zolazepam (10 mg/kg de peso) (Zoletil, Virbac, Carros, Francia) o una combinación de ketamina (5 mg/kg) (Imalgene 1000, Merial, Lyon, Francia) y medetomidina (50 µg/kg) (Domtor, Orion Pharma, Espoo, Finlandia). Los efectos de la medetomidina se revirtieron con la inyección de atipamezole (250 µg/kg) (Antisedan, Pfizer, Madrid, España).

Las dimensiones corporales y testiculares se tomaron antes de la electroeyaculación. Después se calculó el volumen y peso de los testículos como describieron Harcourt et al. (1995) y el peso relativo de testículos (ver capítulos 3 y 4).

La electroeyaculación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Howard (1993) con algunas modificaciones menores. Se aplicó el voltaje mediante una sonda lubricada (17,9 cm de longitud y 13,45 mm de diámetro) (P.T. Electronics, Boring, OR, USA) con tres electrodos longitudinales (35,7 mm de longitud). La sonda se introdujo en el recto, con los electrodos a la altura de la próstata y las glándulas bulbouretrales. Se aplicaron 100 estímulos eléctricos utilizando un electroeyaculador de corriente alterna a 60-Hz (P.T. Electronics). Los estímulos se agruparon en series de 10 estímulos para cada voltaje (entre 2 - 5 V) y el total se dividió en 4 series (primera serie: 2, 3, 4 V; segunda serie: 3, 4, 5 V; tercera serie: 4, 5 V; cuarta serie: 4, 5 V). El semen se recogió en un contenedor de polipropileno de 25 ml estéril y precalentado (Lab-Center, Madrid, España, referencia 430130).

Del semen recogido en cada serie se evaluó inmediatamente el volumen (con una micropipeta) y el pH (usando tiras reactivas; Medi-Test Combi 9, Machereg-Nagel, Düren, Alemania, catálogo 93023). Se colocó una alícuota de semen entre porta y cubreobjetos precalentados a 37°C y se examinó en contraste de fase para valorar la motilidad, el % de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento usando una escala de 0-5, donde 0 representa la ausencia de movimiento y 5 un movimiento rápido, lineal y progresivo (Howard 1992). Se calculó el Índice de Motilidad Espermática (SMI):

$$SMI = \frac{\%móviles + (calidad \times 20)}{2}$$

Además, después de cada serie de la electroeyaculación, se fijaron 5 µl de semen con 45 µl de solución de glutaraldehído al 1% tamponado con cacodilato 0,165 M, pH 7,3. Esta suspensión fijada se utilizó para estimar la concentración espermática con hemocitómetro. Además se fijó otra alícuota de 10 µl de semen con 250 µl de paraformaldehído al 4% en solución tampón con 110 mM de Na₂HPO₄ y 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4) que se tiñó más tarde con azul de Coomassie (Larson y Miller 1999) para valorar la morfología espermática y la integridad acrosómica. Las muestras fijadas se almacenaron a 4°C hasta el momento en que se procesaron.

Las muestras de semen se diluyeron con igual volumen de medio F-10 de Ham con suero fetal bovino (FBS) si no se indica lo contrario (ver más abajo), y se guardaron a temperatura ambiente (20 °C) hasta completar las series de la electroeyaculación y utilizarlo para criopreservación.

Para la tinción con azul de Coomassie, las muestras fijadas en paraformaldehído se centrifugaron durante 8 min a 1700 xg (5000 rpm) en una microfuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), el sobrenadante se retiró y eliminó y se añadieron 250 µl de solución de acetato de amonio 0,1 M (pH 9,0) en agua destilada. Este paso se repitió dos veces. Después del segundo lavado el pellet se resuspendió en aproximadamente 50 µl de

acetato de amonio. La suspensión espermática se extendió en dos portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secos, los frotis se tiñeron con 50 µl de solución colorante de azul de Coomassie (0,22% de azul brillante de Coomassie R-250; Sigma, Madrid, España) en 50% metanol (BDH, Madrid, España) y 10% ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, España) durante 90 s y se lavaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y se conservaron colocando encima un cubreobjetos con unas gotas de medio de montaje (DPX mountant for microscopy; BDH).

La morfología de los espermatozoides se evaluó clasificando lo espermatozoides como normales, o con anomalías en la cabeza (macrocefálico, microcefálico, bicefálico), en la pieza media (anormal o doblada) o en el resto del flagelo (con dos o tres piezas principales y terminales, doblado). Se contabilizaron y clasificaron 100 espermatozoides. La presencia de gota citoplasmática se contabilizó pero no como anomalía sino como indicador de inmadurez espermática. Además se registró la presencia de colas enrolladas (que puede producirse como consecuencia de choque térmico). Los acrosomas se clasificaron como: (1) normal intacto, en aquellos casos en los que el espermatozoide presenta tinción intensa y uniforme de la región acrosómica y con la región post-acrosómica no teñida; (2) anormal intacto, en los espermatozoides que presentan la región acrosomal teñida pero con una tinción más oscura en la zona apical; (3) dañado, aquellos casos en los que aparecen manchas más claras en la región acrosómica; (4) no intacto o perdido, cuando la región acrosómica no está teñida o sólo aparece teñida ligeramente la banda ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Pukazhenti *et al.* 2006b).

Incubación de espermatozoides en diferentes medios y sueros

Se examinó la capacidad de los espermatozoides de lince ibérico de sobrevivir *in vitro* utilizando los medios complejos F-10 de Ham o TCM-199 ambos tamponados con Hepes y suplementados con FBS o suero homólogo. Al medio F-10 de Ham con Hepes (Irvine Scientific, Izasa, Barcelona, España) se le añadió un suplemento liofilizado (Irvine Scientific) que contenía 0,05 M de glutamina, 0,05 M de piruvato y 500 µg/ml de sulfato de gentamicina que se diluyó 1:50. El medio TCM-199 también contenía Hepes (Sigma). Tanto el F-10 de Ham como el TCM-199 se suplementaron con L-glutamina (Sigma) (concentración final 2 mM), piruvato (Sigma) (concentración final 1 mM), y un triple antibiótico (Sigma) (concentración final 130 IU/ml de penicilina, 130 µg/ml de estreptomina y 260 µg/ml de neomicina, respectivamente). A los medios se les añadió además un 5% de suero fetal bovino inactivado y filtrado (filtro de 0,22 µm) (FBS) (Gibco Invitrogen, Barcelona, España). El medio F-10 de Ham se suplementó en algunos experimentos con suero de lince ibérico inactivado (a 56°C durante 30 min) y filtrado (filtro de 0,22 µm) antes de su uso.

Se utilizaron alícuotas de 7,5 µl de semen de la serie 2 de la electroeyaculación, que se diluyeron en 67,5 µl de cada medio, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubaron en un bloque térmico seco, al aire, a 37°C. Se tomaron alícuotas en el momento de la dilución, a la hora y a las 3 h de incubación (0, 1 y 3 h) y se evaluó la motilidad empleando contraste de fases y se fijó otra alícuota en paraformaldehído 4% para teñir posteriormente con azul de Coomassie y evaluar integridad acrosómica.

Criopreservación de espermatozoides

Tras la recogida y evaluación inicial, el semen se diluyó 1:1 (v/v) en medio F-10 de Ham modificado con Hepes. Cada muestra se conservó a temperatura ambiente (22°C) hasta que finalizó la recogida de semen de cada macho. Las fracciones con calidad parecida se juntaron. Los "pools" de semen se centrifugaron a 300 - 700 xg (dependiendo de la calidad de la muestra) durante 10 min, se retiró y descartó el sobrenadante (previa evaluación de una gota al microscopio), se midió el volumen del pellet resultante con una micropipeta y se añadió el diluyente de congelación lentamente (1:4, v/v), gota a gota, a temperatura ambiente.

Para la criopreservación del semen se evaluaron dos criodiluyentes: (a) TEST, un diluyente con 4,83% Tes, 1,15% Tris, 0,4% glucosa, 200 IU/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina, 20% de yema de huevo y 4% de glicerol y (b) Biladyl, un diluyente comercial (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) con 2,42% Tris, 1% fructosa, 1,38% de ácido cítrico, 20% de yema de huevo y 4% glicerol; este diluyente se suplementó con una mezcla de antibióticos que contenía tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina (Minitüb). El Biladyl está constituido por dos soluciones: la solución A que no contiene glicerol y la solución B, con 14% glicerol. Este diluyente se añade habitualmente en dos pasos, añadiendo la solución A antes de la refrigeración y la solución B al final de la refrigeración. Hemos utilizado las dos soluciones para preparar un único diluyente, mezclándolas para obtener una concentración final del 4%.

De cada suspensión espermática en diluyente de congelación, se cargaron, a temperatura ambiente (alrededor de 22°C), 50 µl en pajuelas cortas. Antes de cargarlas, las pajuelas de 0,25 ml (Minitüb) se cortaron por la mitad con unas tijeras; se utilizó la mitad sellada con algodón y se descartó la otra mitad. Una vez cargadas, las pajuelas se cerraron con un sellador térmico (ERSA, Minitüb) y se colocaron dentro de un criovial de 5 ml para su refrigeración. Una alícuota de suspensión espermática se reservó en un microtubo eppendorf y se utilizó para la evaluación de motilidad e integridad acrosómica una vez terminada la refrigeración.

La temperatura se hizo bajar de 20 a 5°C en 120 min utilizando un bloque seco programable (ThermoStat plus 5352, Eppendorf, Hamburg, Alemania) con una cámara a medida (CombiBox, Eppendorf), tal como se describe en el Anexo I.

Finalizada la refrigeración las pajuelas se extrajeron del criovial de 5 ml y se congelaron siguiendo un sistema en dos niveles sobre vapores de nitrógeno (Pukazhenthil *et al.* 2007). Las pajuelas se colocaron horizontalmente sobre una gradilla metálica dentro de una caja de poliestireno expandido, a 7,5 cm sobre la superficie del nitrógeno, durante 1 min, y después rápidamente colocadas en el segundo nivel de la gradilla a 2,5 cm sobre el nivel de nitrógeno durante 1 min más antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido. Las pajuelas congeladas se colocaron en un vial de 5 ml que se introdujo en una caña metálica y se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su transporte y almacenamiento.

Descongelación y valoración de espermatozoides

Para su descongelación las pajuelas se extrajeron del nitrógeno líquido y se expusieron al aire durante 10 s y después se sumergieron en solución salina dentro de un baño a 37°C durante 30 s. El contenido de las pajuelas se vertió en un microtubo estéril de 1,5 ml precalentado a 37°C. La suspensión espermática se diluyó (1:3 v/v) añadiendo lentamente, gota a gota, una solución modificada de Tyrode (Gómez *et al.* 2003), como la usada para IVF (ver debajo). La concentración espermática se ajustó a $0,5 - 1 \times 10^5$ espermatozoides móviles/ml en cada gota de 50-100 µl cubierta con aceite mineral. Los espermatozoides diluidos se incubaron a 38,5°C en atmósfera de 5% CO₂/aire y se tomaron alícuotas para valoración de motilidad e integridad acrosómica, como se ha explicado anteriormente, a varios tiempos (0, 1, 2 h).

Recogida y maduración in vitro (IVM) de oocitos de gata

Se obtuvieron los ovarios de gatas domésticas después de ovariectomía en clínicas veterinarias y se transportaron en refrigeración al laboratorio dentro de un vial de 15 ml con 5 ml de 0,9% (p/v) de solución fisiológica (NaCl) suplementada con penicilina y estreptomicina (100 µg/ml, de cada una). Los ovarios que no se procesaron inmediatamente se almacenaron entre 4 - 8°C para su procesamiento antes de que transcurrieran 24 h desde la cirugía. Las muestras se procesaron como se ha descrito en trabajos anteriores (Gómez *et al.* 2003), con algunas modificaciones. Se cortaron los ovarios y se perforaron los folículos con un par de agujas 21G unidas a sendas jeringas desechables para liberar los complejos cúmulo-oocito (COCs). Para la recogida de los oocitos se utilizó medio TCM-199 (Sigma), suplementado con 15 mM de Hepes, 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 0,4% (v/v) de BSA (Sigma, A-8412) y penicilina y estreptomicina (100 µg/ml, de cada una). Después de varios lavados en TCM-

199 tamponado con Hepes, se seleccionaron los COCs de grado I a grado III (grado I: calidad excelente; grado II: calidad buena; grado III: calidad aceptable) y se colocaron en una placa de cultivo de 4 pocillos (Nunclon, Nalgene, Nunc International, Roskilde, Dinamarca) con 500 µl de TCM-199 suplementado con 25 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 1,12 mM de cisteína, 0,4% (p/v) de BSA (Fracción V, Sigma, A-9418), 25 ng/ml de EGF (Merlo *et al.*, 2005), FSH/LH ovina (Sigma, 10 µg/ml de cada una), 1 µg/ml de estradiol, penicilina y estreptomicina (100 µg/ml de cada uno). Las placas se incubaron a 38,5°C en atmósfera de 5% CO₂/aire y humedad máxima durante 24 h.

Fecundación in vitro (IVF)

Después de 24 h de maduración *in vitro*, los oocitos de gato doméstico se coincubaron con espermatozoides congelados-descongelados de lince ibérico. Como control de fecundación se utilizaron espermatozoides epididimarios de gato doméstico. Para la IVF, los oocitos (10 - 20 por gota) se dispusieron en gotas de 50-100 µl de solución de Tyrode suplementada con 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM de lactato de calcio, 1 mM de glutamina y penicilina/estreptomicina (100 µg/ml de cada uno) que contenía 0,6% (p/v) BSA (libre de ácidos grasos, catálogo 1265479, Calbiochem, Madrid, España) (Gómez *et al.* 2003, Pope *et al.* 2006a). Los oocitos se coincubaron, bajo aceite mineral, con 0,5-1 x 10⁵ espermatozoides móviles/ml en una atmósfera de 5% de CO₂/aire a 38,5°C durante 18-20 h.

Cultivo in vitro

Tras el cocultivo de los gametos, los oocitos se pipetearon cuidadosamente para eliminar las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos y se lavaron tres veces con medio de Tyrode con Hepes. Los presuntos cigotos se transfirieron a una placa de cultivo con 4 pocillos con 500 µl de solución de Tyrode con 1% (v/v) de MEM-amino ácidos no esenciales, 0,3% (p/v) de BSA (libre de ácidos grasos) y se suplementó con 15 mM de NaHCO₃, 0,36 mM de piruvato, 2,2 mM de lactato de calcio, 1 mM de glutamina y penicilina y estreptomicina (100 µg/ml de cada uno) (Gómez *et al.* 2003, Pope *et al.* 2006a). El cultivo se llevó a cabo bajo atmósfera de 5% CO₂/aire a 38,5°C. La división fue evaluada 44 - 48 h post-inseminación. Para valorar el estado de maduración y fecundación y los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida de los oocitos no divididos y el número de núcleos de los embriones, se utilizó tinción con Hoechst 33342 (10µg/ml) en glicerol (1:9, v/v). Las muestras se montaron en un portaobjetos y un cubreobjetos sobre una base de parafina/vaselina (10:0,7 p/p) que se conservó en la nevera hasta su uso.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con SPSS, versión 11.5. Los resultados se presentan como media \pm SEM. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para examinar las diferencias en motilidad e integridad acrosómica, entre tratamientos y a lo largo del tiempo, se utilizó ANOVA de medidas repetidas (RMANOVA). Cuando el RMANOVA dio resultado significativo, se realizaron comparaciones múltiples. Para comparar las tasas de fecundación de los espermatozoides conservados en TEST o Biladyl se utilizó un test no paramétrico para dos muestras dependientes. Las relaciones entre tasas de fecundación y características del eyaculado se analizaron mediante correlación no paramétrica de Spearman.

Resultados

Rasgos fenotípicos y parámetros seminales de machos de lince ibérico

Los rasgos fenotípicos y los parámetros espermáticos se presentan en la Tabla 5.1. Los eyaculados contenían $1,48 - 5,37 \times 10^6$ espermatozoides totales (media de $3,34 \pm 0,63 \times 10^6$ número total de espermatozoides). La motilidad espermática varió entre 62 - 90%, con una media de $73,55 \pm 4,63\%$ de espermatozoides móviles. Se calculó un índice de motilidad espermática (SMI) teniendo en cuenta el % de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento de los mismos y cuya media fue $67,34 \pm 2,73$. El lince ibérico mostró un número elevado de espermatozoides pleiomórficos (Fig. 5.1), con valores de espermatozoides morfológicamente normales que variaron entre 15,80% y 37,40% y con una media de $23,68 \pm 4,04\%$ espermatozoides normales (Tabla 5.1). La valoración de la integridad acrosómica (Fig. 5.2), reveló bajos porcentajes de espermatozoides con el acrosoma intacto, variando entre 37,40 y 46,93% y con un promedio de $40,70 \pm 2,35\%$ espermatozoides intactos (Tabla 5.1).

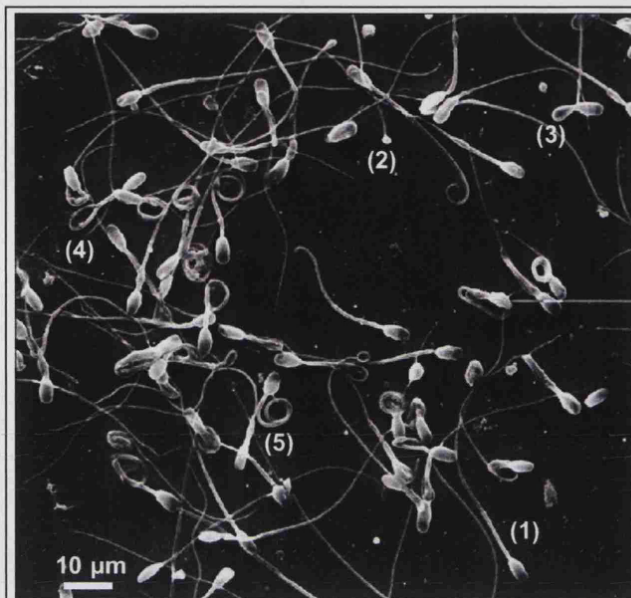
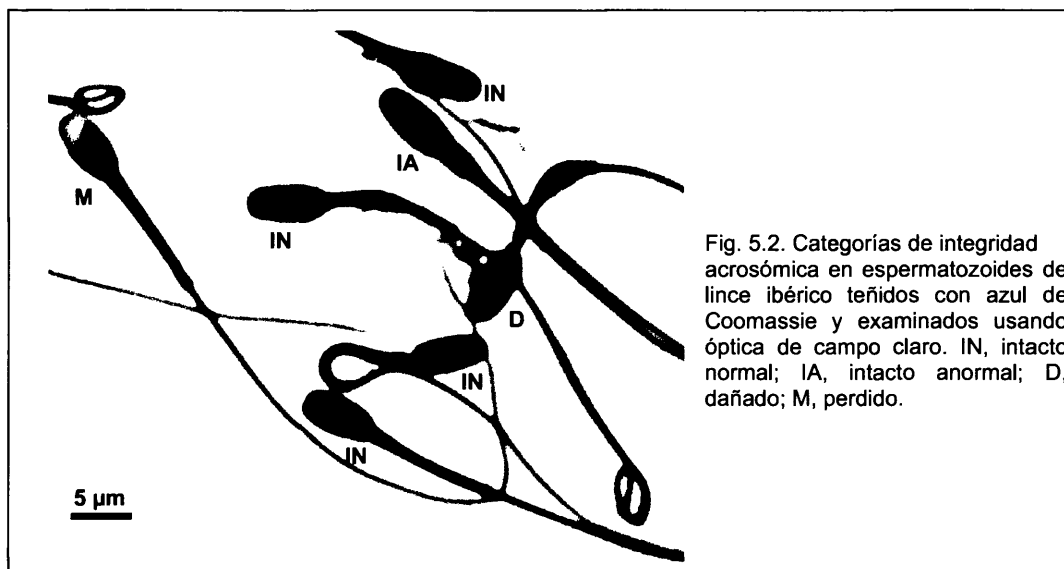


Fig. 5.1. Anormalidades espermáticas en el lince ibérico. Los espermatozoides se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido. (1) normal, (2) defecto de cabeza (microcefálico), (3) pieza media doblada, (4) pieza principal doblada, (5) cola enrollada, (6) cabeza sueltas.

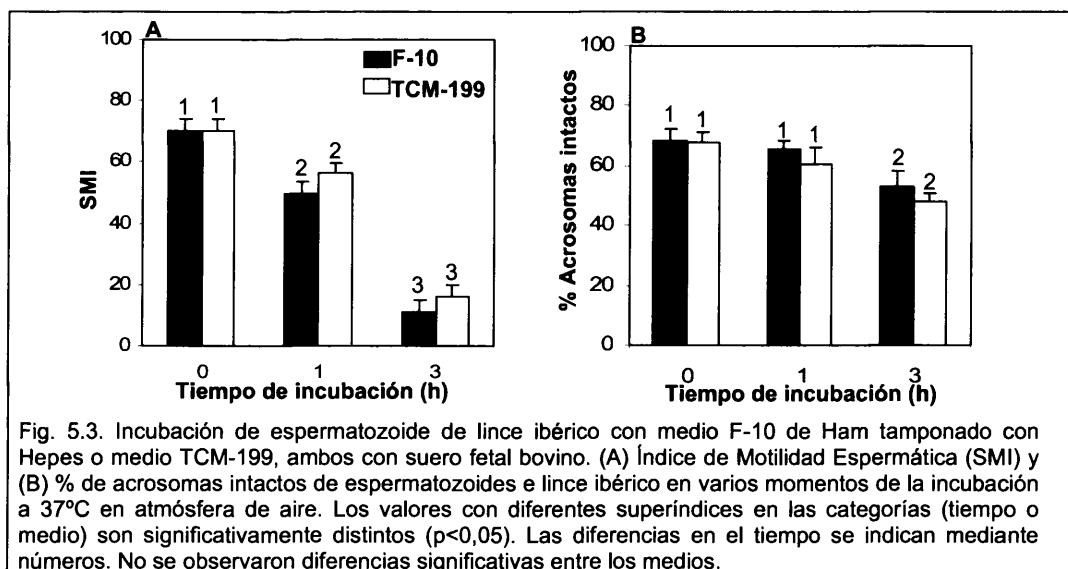
Tabla 5.1. Parámetros fenotípicos y seminales del eyaculado de lince ibérico.

	Macho					Media \pm SEM
	SB5	SB6	SB7	SB8	SB11	
Año de nacimiento	2000	2002	2003	2000	2004	
Masa corporal (kg)	14,3	8,3	10,8	13,4	12,7	11,91 \pm 1,07
Peso total de testículos (g)	2,67	2,74	2,16	2,35	2,74	2,53 \pm 0,12
Peso relativo de testículos ($\times 10^{-4}$)	1,87	3,3	2,00	1,75	2,16	2,21 \pm 0,28
Volumen eyaculado (μ l)	590	340	429	675	383	483,4 \pm 63,91
pH del semen	8,0	8,30	7,8	8,0	7,5	8,02 \pm 0,08
Concentración espermática ($\times 10^6$ esperm./ml)	5,14	15,79	3,45	5,47	8,21	7,61 \pm 2,18
Nº total de espermatozoides ($\times 10^6$)	3,03	5,37	1,48	3,69	3,14	3,34 \pm 0,63
Motilidad (%)	90,05	68,9	71,09	75,34	62,38	73,55 \pm 4,63
Calidad de la motilidad (escala, 0 - 5)	3,28	3,00	2,96	2,94	3,11	3,06 \pm 0,06
Índice de Motilidad Espermática (SMI)	77,81	64,45	65,14	67,05	62,25	67,34 \pm 2,73
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	18,47	28,31	18,22	37,40	15,8	23,68 \pm 4,04
Acrosomas íntegros (%)	38,20	46,93	35,30	45,66	37,4	40,70 \pm 2,35

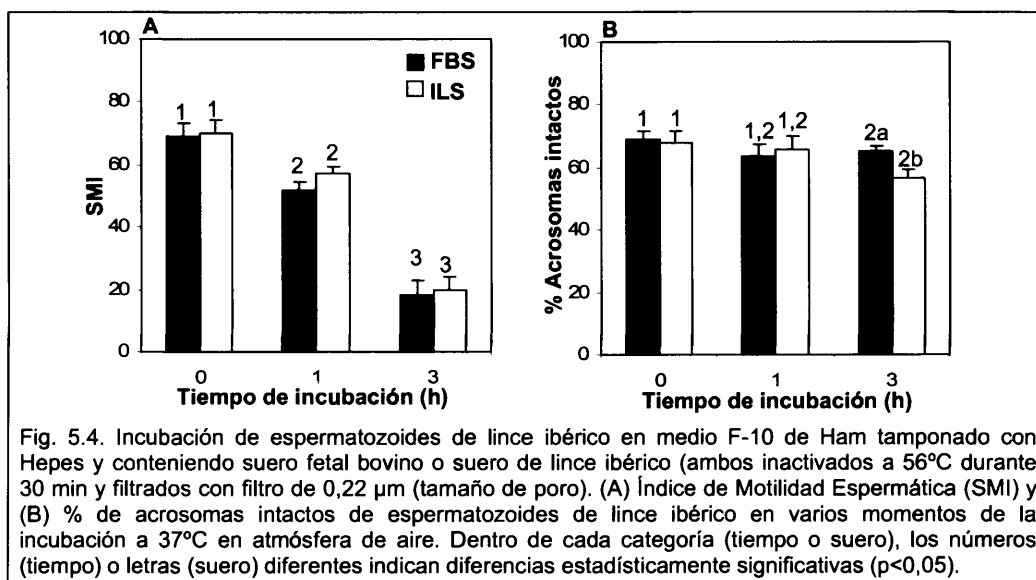


Incubación de espermatozoides en diferentes medios y sueros

Durante la incubación de los espermatozoides en F-10 de Ham o en TCM-199 (con FBS inactivado y filtrado) se observó un descenso considerable del SMI (% de motilidad y calidad de la motilidad) ($p < 0,05$) en ambos casos a lo largo de las 3 h de incubación (Fig. 5.3A). Hubo también descenso del % de acrosomas íntegros a lo largo del tiempo, pero las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las muestras incubadas en TCM-199 (Fig. 5.3B). No hubo diferencias significativas entre los dos medios comparados ni en SMI ni en % de acrosomas íntegros ($p = 0,32$) (Fig. 5.3).



Cuando se suspendieron los espermatozoides en medio F-10 de Ham con suero fetal bovino o de lince ibérico (ambos inactivados), se observó un descenso considerable de la motilidad y una bajada algo menos pronunciada de la integridad acrosómica a lo largo del tiempo con ambos sueros (Fig. 5.4). No se encontraron diferencias en motilidad o integridad acrosómica entre sueros, excepto a las 3 h de incubación, cuando se observó un mayor % de acrosomas íntegros en las muestras incubadas en medio con suero fetal bovino (FBS) que en las incubadas con suero de lince ibérico (ILS) ($p=0,003$) (Fig. 5.4B).



Criopreservación de espermatozoides de lince ibérico

Todos los individuos evaluados produjeron semen de calidad suficiente para criopreservar. El valor promedio de las muestras antes de la centrifugación fue $77,27 \pm 3,70\%$ de espermatozoides móviles, $70,08 \pm 2,66$ SMI y $37,64 \pm 4,48\%$ de espermatozoides con acrosoma intacto.

Hubo descenso de motilidad durante la criopreservación, con considerable caída en motilidad a la descongelación y en la incubación posterior (Fig. 5.6). Hubo diferencias ($p<0,05$) en la motilidad entre criodiluyentes en varios momentos de proceso de criopreservación (Fig. 5.6). Se observaron diferencias después de añadir el criodiluyente, después de la refrigeración, a la descongelación, y a la hora y 2 h de incubación ($p<0,05$). Después de descongelar, los espermatozoides presentaban mejor motilidad en TEST ($34,00 \pm 6,20\%$ de espermatozoides móviles y SMI de $43,00 \pm 2,90$) que en Biladyl ($7,50 \pm 4,80\%$ de espermatozoides móviles y SMI de $11,30 \pm 7,20$). Las muestras de dos machos, SB5 y SB7, no tenían espermatozoides móviles a la descongelación cuando se utilizó Biladyl.

No hubo diferencias en el tiempo en el % de acrosomas íntegros, excepto en las muestras incubadas durante 1 y 2 h tras la descongelación, que mostraron valores significativamente menores ($p < 0,05$). No se han detectado diferencias significativas en el % de acrosomas íntegros entre diluyentes (TEST, $39,40 \pm 5,35\%$ de acrosomas intactos; Biladyl, $32,30 \pm 6,30\%$).

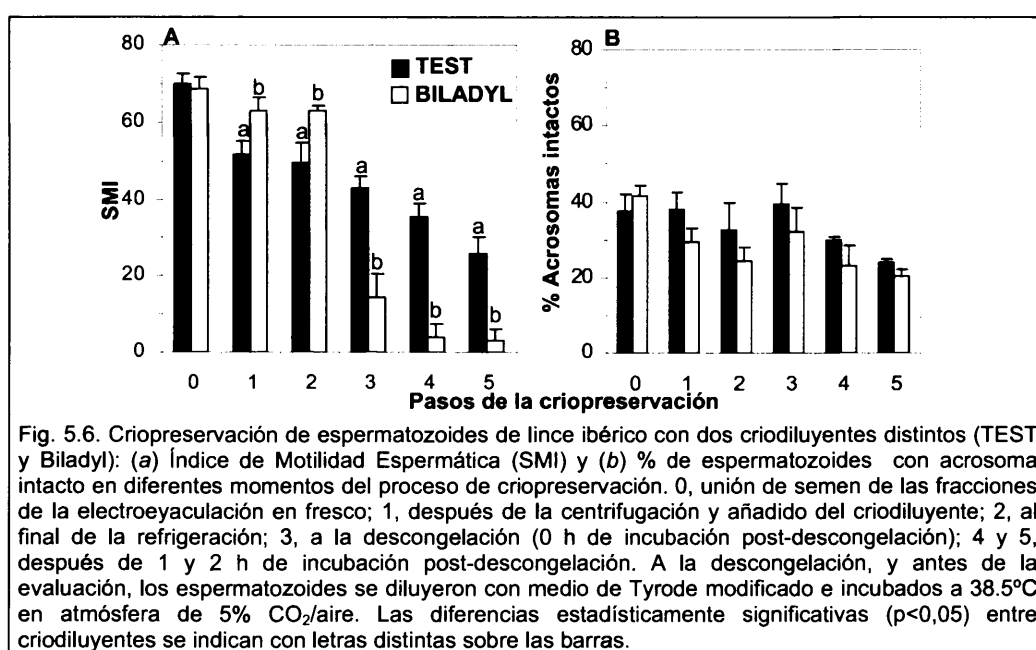


Fig. 5.6. Criopreservación de espermatozoides de lince ibérico con dos criodiluyentes distintos (TEST y Biladyl): (a) Índice de Motilidad Espermática (SMI) y (b) % de espermatozoides con acrosoma intacto en diferentes momentos del proceso de criopreservación. 0, unión de semen de las fracciones de la electroeyaculación en fresco; 1, después de la centrifugación y añadido del criodiluyente; 2, al final de la refrigeración; 3, a la descongelación (0 h de incubación post-descongelación); 4 y 5, después de 1 y 2 h de incubación post-descongelación. A la descongelación, y antes de la evaluación, los espermatozoides se diluyeron con medio de Tyrode modificado e incubados a $38,5^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de $5\% \text{ CO}_2/\text{aire}$. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre criodiluyentes se indican con letras distintas sobre las barras.

Fecundación *in vitro* heteróloga con espermatozoides criopreservados

Los espermatozoides de lince ibérico fueron capaces de fecundar oocitos de gata doméstica *in vitro* (Fig. 5.7). La tasa de fecundación obtenida varió entre 5% y 30% de los oocitos maduros dependiendo del macho y el criodiluyente utilizado para la conservación (Tabla 5.2). La tasa media de fecundación con espermatozoides criopreservados en TEST ($20,5 \pm 4,5\%$ de oocitos maduros) fue más del doble que la obtenida con espermatozoides criopreservados en Biladyl ($11,50 \pm 6,80\%$ de oocitos maduros) (Tabla 5.2) aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística, probablemente debido al limitado número de machos analizados. Utilizando espermatozoides epididimarios de gato doméstico como control se obtuvieron tasas de fecundación de $31,0 \pm 11,7\%$ de oocitos maduros para los espermatozoides criopreservados en TEST y $10,0 \pm 4,7\%$ para los espermatozoides criopreservados en Biladyl, pero la diferencia no fue significativa.

El porcentaje de oocitos maduros y fecundados que se dividió (embriones al menos en dos células 48 h post-inseminación) fue del $11,30 \pm 5,30\%$ y $44,70 \pm 19,60\%$,

respectivamente, con espermatozoides criopreservados en TEST. No hubo relación entre la proporción de oocitos maduros fecundados y la proporción de oocitos que se dividió.

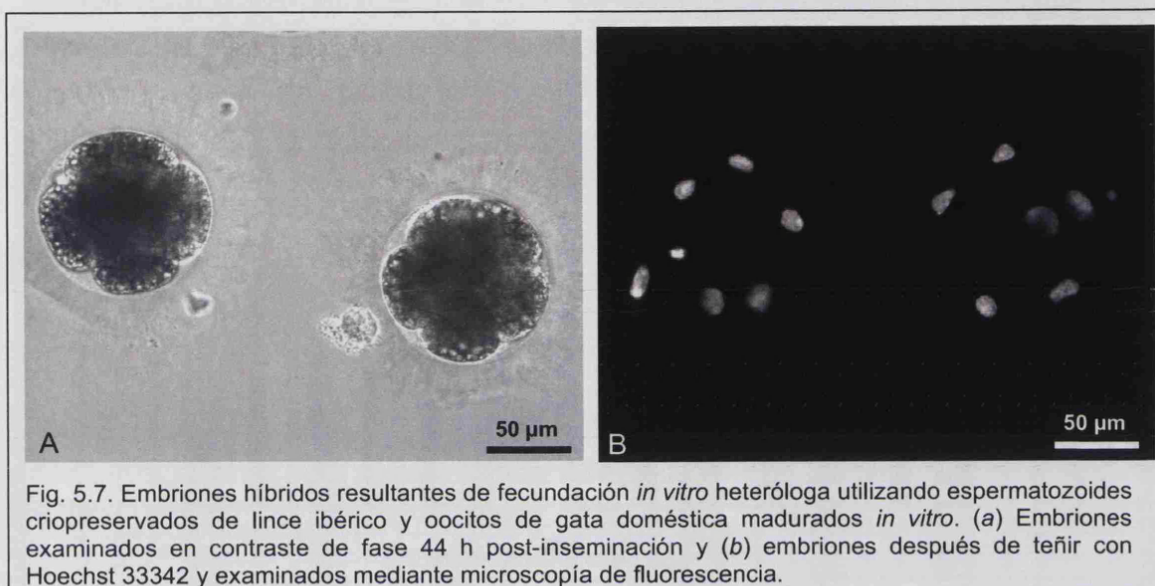


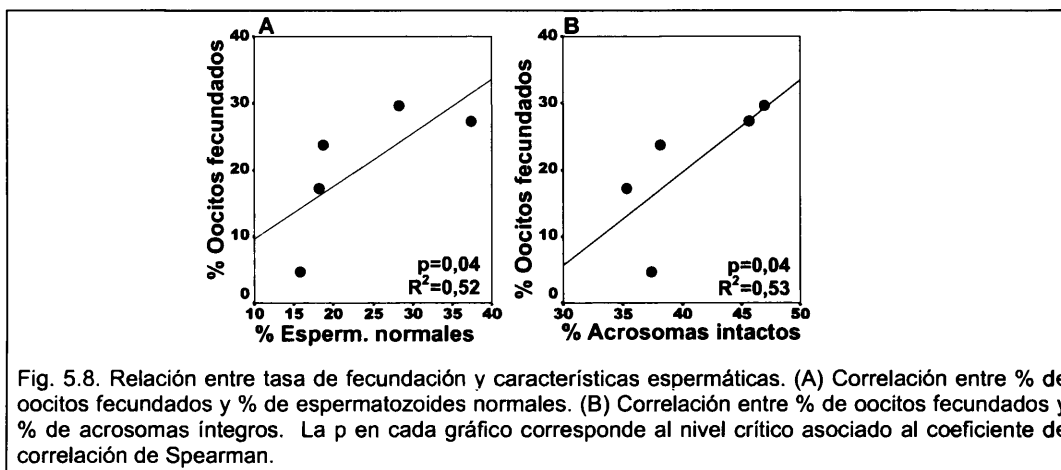
Fig. 5.7. Embriones híbridos resultantes de fecundación *in vitro* heteróloga utilizando espermatozoides criopreservados de lince ibérico y oocitos de gata doméstica madurados *in vitro*. (a) Embriones examinados en contraste de fase 44 h post-inseminación y (b) embriones después de teñir con Hoechst 33342 y examinados mediante microscopía de fluorescencia.

Tabla 5.2. Fecundación *in vitro* heteróloga de oocitos de gato doméstico madurados *in vitro* con espermatozoides congelados-descongelados de lince ibérico.

Macho	TEST					Biladyl				
	Nº oocitos fecundados / Nº oocitos maduros (%)	Nº esperm. adheridos por oocito maduro	Nº oocitos divididos / Nº oocitos fecundados (%)	Nº oocitos divididos / Nº oocitos maduros (%)	Nº oocitos fecundados / Nº oocitos maduros (%)	Nº esperm. adheridos por oocito maduro	Nº oocitos divididos / Nº oocitos fecundados (%)	Nº oocitos divididos / Nº oocitos maduros (%)	Nº oocitos fecundados / Nº oocitos maduros (%)	Nº oocitos fecundados / Nº oocitos maduros (%)
SB5	5/21 (24)	1,7	0/5 (0)	0/21 (0)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)
SB6	11/37 (30)	0,4	7/11 (64)	7/37 (19)	1/21 (5)	0,8	1/1 (100)	1/21 (5)	1/21 (5)	1/21 (5)
SB7	5/29 (17)	2,7	3/5 (60)	3/29 (10)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)	nd (*)
SB8	9/33 (27)	5,1	9/9 (100)	9/33 (27)	4/22 (18)	3,1	3/4 (75)	3/22 (14)	3/22 (14)	3/22 (14)
SB11	1/21 (5)	0,5	0/1 (0)	0/21 (0)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Media±SEM	20,5 ± 4,5	2,1 ± 0,9	44,7 ± 19,6	11,3 ± 5,3	11,5 ± 6,8	1,9 ± 1,1	87,5 ± 12,5	9,2 ± 4,5	9,2 ± 4,5	9,2 ± 4,5

La concentración espermática fue 0,5 - 1 x 10⁵ espermatozoides móviles/ml. La fecundación fue valorada después de 18-20 h de cocultivo de gametos. La división se valoró a las 44 - 48 h de cultivo post-fecundación. Los oocitos divididos y no divididos fueron teñidos con Hoechst 33342 (10µg/ml) en glicerol (1:10 v/v) para valorar retrospectivamente la maduración y fecundación. nd = no determinado. (*) El semen de dos machos no sobrevivió a la criopreservación en Biladyl, presentando un 0% de espermatozoides móviles a la descongelación; por tanto, la fecundación *in vitro* no pudo realizarse con espermatozoides de estos dos machos en este criodiluyente.

Dado que la morfología espermática y la integridad acrosómica tienen un papel esencial en la fecundación, permitiendo al espermatozoide penetrar la zona pelúcida, y los espermatozoides de gatos teratospérmicos tienen comprometida su capacidad de interacción con los oocitos *in vitro* (Pukazhenthil *et al.* 2006c), se han explorado las posibles relaciones entre tasas de fecundación de los diferentes machos y las características del semen en fresco. Se observó relación positiva y significativa entre la tasa de fecundación y tanto el porcentaje de espermatozoides normales (Fig. 5.8A) como el porcentaje de acrosomas intactos (Fig. 5.8B).



Recogida y criopreservación de espermatozoides epididimarios de lince ibérico

Se tuvo la oportunidad de recoger espermatozoides epididimarios de un macho de lince ibérico (muerto en un atropello por un coche), criopreservarlos en TEST, como se ha descrito para espermatozoides eyaculados, y examinar su capacidad fecundante. Encontramos que cuando se coincubaron estos espermatozoides a la descongelación con oocitos de gata doméstica madurados *in vitro*, 2/33 (6,1%) de los oocitos maduros fueron fecundados y 1/2 (50%) de los oocitos fecundados se dividió. Hubo una media de 1,6 espermatozoides adherido a cada oocito maduro. Estos resultados fueron menores que los obtenidos con espermatozoides eyaculados de lince ibérico y los obtenidos en otros estudios que utilizaron espermatozoides epididimarios de gato doméstico (ver capítulo 1). En cualquier caso, los resultados obtenidos con espermatozoides epididimarios de lince ibérico indican que es posible rescatar este material biológico para su almacenamiento y conservación en un banco de recursos genéticos para su uso futuro en reproducción asistida.

Discusión

Este estudio ha permitido caracterizar los parámetros espermáticos en el lince ibérico, explorar la idoneidad de dos diluyentes de congelación de semen, y examinar la capacidad

fecundante de los espermatozoides criopreservados usando un ensayo de fecundación *in vitro* heteróloga con oocitos de gato doméstico.

El número total de espermatozoides recogidos en eyaculados de linces ibéricos electroestimulados fue bajo (media $3,3 \times 10^6$ espermatozoides). En otros felinos de mediano tamaño el número total de espermatozoides después de la electroeyaculación usando un protocolo similar fue mucho más alto: ocelote, 190×10^6 espermatozoides (Stoops *et al.* 2007), serval, 101×10^6 espermatozoides (Pukazhenthithi *et al.* 2002), gato pescador, 56×10^6 espermatozoides (Thiangtum *et al.* 2006), caracal, 41×10^6 espermatozoides (Howard 1993) o lince rojo, $10,01 \times 10^6$ espermatozoides (capítulo 3, aunque estudios anteriores revelaban una producción de alrededor de $0,8 \times 10^6$ espermatozoides en el eyaculado (Howard 1993)). Por otra parte, los valores observados en el lince ibérico son mayores que los registrados para otras especies de lince como el lince euroasiático, con $1,60 \times 10^6$ espermatozoides totales en el eyaculado durante la época de cría (Jewgenow *et al.* 2006).

La proporción de espermatozoides móviles del eyaculado del lince ibérico (media de $73 \pm 4,6\%$) fue menor que la observada en el ocelote ($83,3 \pm 3,0\%$; Stoops *et al.* 2007) o el caracal ($85,0 \pm 4,0\%$; Howard 1993), pero fue similar a la observada en el gato pescador ($73 \pm 4\%$, Thiangtum *et al.* 2006), el serval ($73,0 \pm 1,8\%$; Pukazhenthithi *et al.* 2002) o el lince euroasiático ($77,0\%$; Jewgenow *et al.* 2006). También el valor registrado en el lince ibérico fue mayor que los valores observado en el lince rojo ($48,0 \pm 8,6\%$; Howard 1993, $55,71 \pm 5,76$; capítulo 3).

El porcentaje de acrosomas intactos en el eyaculado de lince ibérico ($40,7 \pm 2,3\%$) fue bajo en comparación con los valores observados en el gato pescador (90%, Thiangtum *et al.* 2006), el ocelote (94%, Baudi *et al.* 2008) o el gato de Pallas (95%, Swanson *et al.* 2006), aunque fue similar al encontrado en el bobcat ($43,7 \pm 3,8\%$, capítulo 3) y superior al visto en lince euroasiático (26%; Jewgenow *et al.* 2006).

Varias especies de felinos exhiben alta prevalencia de teratospermia, presentando más de 60% de espermatozoides morfológicamente anormales en el eyaculado (Pukazhenthithi *et al.* 2006c). Los espermatozoides de machos teratospérmicos tienen comprometida su capacidad funcional. Estos espermatozoides tienen reducida la capacidad de experimentar la capacitación y la reacción acrosómica, unión y penetración de la zona pelúcida, penetración en el espacio perivitelino, y fecundación de oocitos conespecíficos. Incluso los espermatozoides normales de estos machos teratospérmicos tienen mermada la capacidad de penetrar la zona pelúcida (Pukazhenthithi *et al.* 2006c). Los valores de espermatozoides normales varían ampliamente en felinos (Wildt *et al.* 1983, 1986b; revisado por Pukazhenthithi *et al.* 2006c), con algunas especies que muestran número elevado de espermatozoides normales, como el ocelote (78%; Stoops *et al.* 2007, Baudi *et al.* 2008), el gato de Bengala (65%, Howard y Wildt 1990) o el serval (64%, Pukazhenthithi *et al.* 2002) y otros con niveles extremos de teratospermia como los observados en el guepardo con una media de 12% de espermatozoides normales (Roth *et al.* 1995) y en la

pantera de Florida con una media del 6% de espermatozoides normales (Barone *et al.* 1994). Cuando se ordenan las especies de felinos según la proporción de espermatozoides normales (Pukazhenth *et al.* 2006c), el lince ibérico se encuentra en la parte más baja del rango (ver Fig.1 en la Discusión General). Los machos de lince ibérico producen un alto número de espermatozoides pleiomórficos, con un bajo valor promedio de espermatozoides morfológicamente normales (16 - 37%). Estos valores son similares a los registrados en otras especies de lince (linco euroasiático: $28,7 \pm 13,0\%$, Howard 1993; $26,0\%$, Jewgenow *et al.* 2006; lince rojo, $20,3 \pm 4,7\%$, Howard 1993; $14,7 \pm 2,1$, capítulo 3).

Se puede argumentar que los parámetros seminales presentados en este trabajo en base a las muestras de semen recogidas alrededor de 1,5 meses antes del pico de cópulas puedan no reflejar la calidad del eyaculado durante la época de cría. El lince ibérico parece tener un periodo reproductivo restringido a 2 meses. Aunque esto pueda ser así para las hembras, no se sabe si la producción de espermatozoides se extiende más allá de ese periodo. Hemos recogido semen en abril, y la calidad de estas muestras no ha diferido significativamente de la registrada a finales de noviembre y principios de diciembre. Se necesitarán trabajos futuros para analizar la calidad seminal en el pico de la época de cría. Otro factor que podría estar afectando la calidad seminal es la consanguinidad. Trabajos previos con otras especies de felinos han revelado la existencia de relación entre baja variabilidad genética en diferentes poblaciones, con una calidad seminal pobre (revisado en Roldan y Gomendio 2009). Por tanto, la baja calidad espermática detectada en el lince ibérico podría ser resultado de una reducida variabilidad genética. En el futuro deberían realizarse también estudios encaminados a explorar esta posibilidad.

Aunque el medio F-10 de Ham se ha usado para IVF con buenos resultados en varias especies de felinos, incluyendo el tigre (Donoghue *et al.* 1990; Johnston *et al.* 1991), el puma y el león (Johnston *et al.* 1991), y el guepardo (Donoghue *et al.* 1992a), hemos encontrado que el F-10 de Ham no permite a los espermatozoides de lince ibérico sobrevivir a largo plazo (el SMI cayó desde un valor inicial de 70 hasta alrededor de 15 al final de una incubación de 3 h). El medio analizado como alternativa en este estudio (TCM-199) no resultó mejor para mantener la motilidad espermática durante este tiempo. Cuando el suero fetal bovino o el suero de lince ibérico se examinaron como suplemento del medio F-10, se observó un descenso de la motilidad espermática y la integridad acrosómica a lo largo del tiempo con ambos sueros. Hubo un descenso mucho mayor del SMI que de la integridad acrosómica independientemente del suero utilizado, pero no se observaron diferencias entre sueros. Por tanto, el suero homólogo no incrementa la supervivencia de los espermatozoides durante la incubación e, independientemente del medio o del suero usado, hubo un marcado descenso de la motilidad espermática. Son necesarios más estudios para identificar medios de incubación de espermatozoides alternativos.

Se encontraron diferencias entre TEST y Biladyl en el porcentaje de espermatozoides móviles a la descongelación, con resultados significativamente mejores en las muestras congeladas en TEST. No se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de acrosomas íntegros. El porcentaje de espermatozoides de lince ibérico móviles a la descongelación después de criopreservarlos en TEST (34% de espermatozoides móviles; 43 SMI) fue menor del 50-55 SMI registrado para gato pescador (Thiangtum *et al.* 2006) pero mejor que los valores observados después de la criopreservación de espermatozoides de ocelote (25% de espermatozoides móviles y 40 de SMI; Stoops *et al.* 2007), usando en todos los casos TEST con 20% yema de huevo y 4% glicerol y un procedimiento de refrigeración y congelación similar. La proporción de acrosomas íntegros a la descongelación en espermatozoides de lince ibérico criopreservados en TEST fue del 39%. Aunque bajos, estos valores son similares a aquellos encontrados en otros felinos de pequeño tamaño como el gato pescador (20%; Thiangtum *et al.* 2006), o el ocelote (25%; Stoops *et al.* 2007) siguiendo un protocolo similar de criopreservación. Los resultados encontrados después de la criopreservación de espermatozoides de lince ibérico fueron similares a los encontrados en lince rojo (capítulo 3).

Se ha sugerido que el porcentaje de espermatozoides anormales y particularmente, la integridad estructural de los mismos, son mejores predictores de la supervivencia espermática a la descongelación que el porcentaje de espermatozoides móviles en fresco (Pukazhenthir *et al.* 2007). Se ha examinado la posible relación entre el porcentaje de espermatozoides normales o el porcentaje de acrosomas íntegros antes de la criopreservación y la motilidad a la descongelación y no hemos encontrado relación significativa.

Se ha demostrado que los espermatozoides de lince ibérico son capaces de fecundar oocitos viables de gato doméstico madurados *in vitro*, lo que abre la posibilidad de examinar la capacidad funcional de los espermatozoides de esta especie bajo condiciones de laboratorio. Hubo diferencias entre las tasas de fecundación alcanzadas por los distintos machos de lince ibérico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos que indican que las tasas de fecundación muestran un alto grado de variación entre machos (Howard y Wildt 1990, Donoghue *et al.* 1992a,b). Para los espermatozoides criopreservados en TEST, la tasa más baja de fecundación (5%) fue la obtenida con los espermatozoides del macho más joven (SB11) utilizado en este estudio (alrededor de 2,5 años de edad en el momento de la recogida de semen). Los mejores resultados fueron los obtenidos con los espermatozoides de un macho de pequeño tamaño (8,3 kg), de alrededor de 3,5 años de edad (SB6).

Las tasas de fecundación se valoraron sobre la base de la división de los oocitos, al menos hasta dos células, junto a la presencia de pronúcleos y corpúsculos polares en los oocitos no divididos 48 h después de la inseminación. La fecundación por espermatozoides criopreservados en TEST (20% de los oocitos maduros) fue alrededor de dos veces el valor alcanzado por los espermatozoides criopreservados en Biladyl (11% de los oocitos maduros)

aunque la diferencia no alcanzó significación estadística, probablemente debido al pequeño número de machos disponibles para este trabajo. Utilizando espermatozoides criopreservados de gato doméstico como control, la fecundación de oocitos maduros fue del 31% y el 10% para TEST y Biladyl, respectivamente. Estos resultados son ligeramente menores que los encontrados en otros estudios (por ejemplo, Swanson *et al.* 2000) sugiriendo que las condiciones en las que hemos trabajado deberían mejorarse en el futuro.

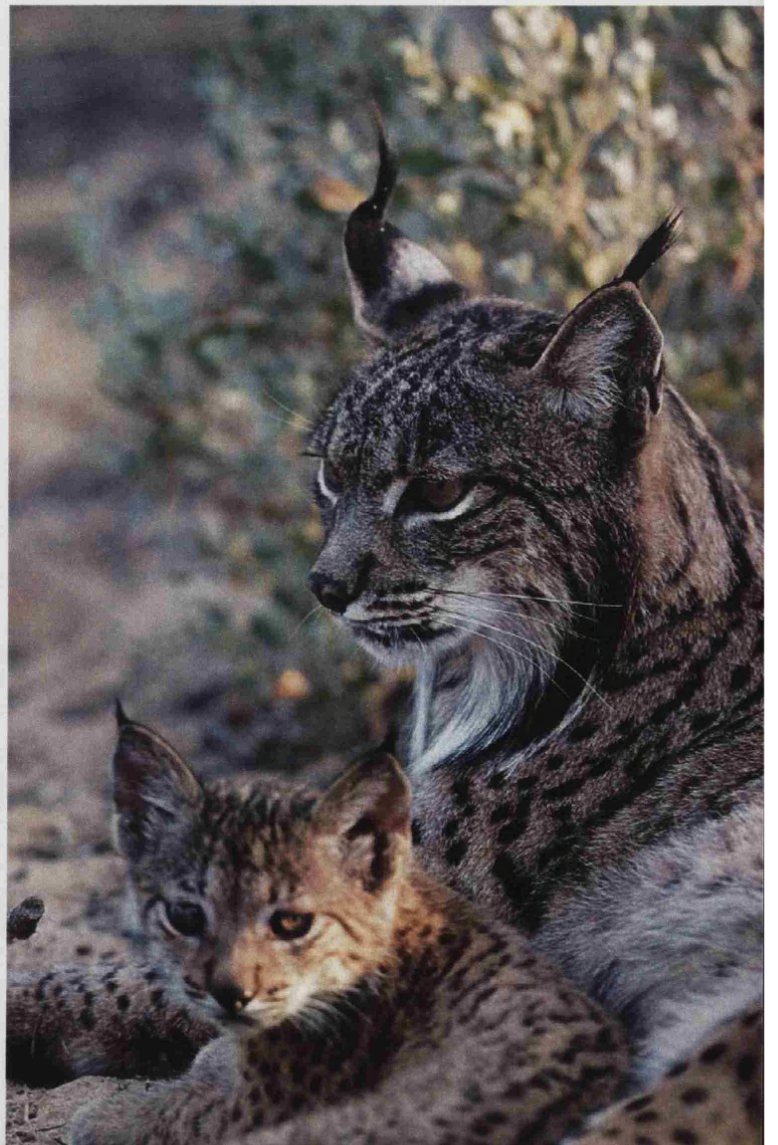
Las tasas de fecundación obtenidas con espermatozoides criopreservados de lince ibérico (20% para espermatozoides criopreservados en TEST) son menores que las obtenidas con espermatozoides eyaculados y criopreservados de otros felinos de mediano tamaño, utilizando condiciones parecidas de coincubación con oocitos de gato doméstico madurados *in vitro* (y valorados en base a la división embrionaria, al menos hasta dos células, 48 h después del inicio del cocultivo de gametos). Los espermatozoides de gato de Bengala fecundaron alrededor del 55% de los oocitos de gato (Howard y Wildt 1990), los espermatozoides de gato pescador fecundaron un 62% de los oocitos de gato madurados *in vitro* (Thiangtum *et al.* 2006), mientras que los espermatozoides de ocelote mostraron una tasa de fecundación del 64% (Stoops *et al.* 2007). Los espermatozoides de gato de Pallas exhibieron una capacidad de fecundar ligeramente menor (46% de oocitos madurados *in vivo*) (Swanson *et al.* 2006) aunque mayor que los espermatozoides de lince ibérico. Varias razones pueden explicar las menores tasas de fecundación ocurridas con los espermatozoides del lince ibérico. Por ejemplo, el hecho de que sean recogidos justo antes de la época de cría puede resultar en una funcionalidad subóptima, por ejemplo, de la capacidad para llevar a cabo los cambios requeridos para la fecundación. Otra razón del bajo éxito reproductivo puede estar relacionado con la pobre calidad espermática de esta especie (promedio de 24% espermatozoides normales y 41% con acrosomas intactos) en comparación con otras especies de felinos (ver más arriba).

Debido a que la morfología y la integridad acrosómica tienen un papel esencial en la fecundación, posibilitando a los espermatozoides la penetración la zona pelúcida (Yanagimachi 1994; Gomendio *et al.* 2007), hemos explorado las posibles relaciones entre las tasas de fecundación y los parámetros seminales en fresco de los machos considerados. Encontramos una relación positiva y significativa entre el porcentaje de fecundación heteróloga y tanto el porcentaje de espermatozoides normales como el porcentaje de acrosomas intactos, similares a las relaciones encontradas usando ensayos de fecundación *in vitro* en otras especies (Amman y Hammerstedt 1993; Gadea 2005; Aitken 2006). Estos resultados son importantes porque podrían permitirnos analizar en profundidad la funcionalidad de los espermatozoides de lince ibérico. Dado que las oportunidades para probar la fertilidad de los espermatozoides usando inseminación artificial o IVF con oocitos homólogos pueden ser muy limitadas, el

empleo de oocitos de gato doméstico proporcionará la posibilidad de evaluar los machos antes de la época de cría o los espermatozoides criopreservados en un banco de recursos genéticos.

En conclusión, este estudio representa la primera investigación detallada de las características seminales básicas y la criopreservación espermática en el lince ibérico. Nuestros resultados revelan que en esta especie (a) es posible recoger y criopreservar semen de animales cautivos, (b) varias características espermáticas son similares a las de otros felinos de pequeño tamaño y mejores que las registradas para otras especies de lince, (c) el suero homólogo inactivado no resulta mejor para la supervivencia de los espermatozoides que el suero fetal bovino inactivado cuando se añaden al medio de lavado y se incuban en él, (d) no hubo mayores diferencias entre dos medios complejos (F-10 de Ham y TCM-199) en cuanto a la supervivencia espermática ni a la integridad acrosómica, (e) los espermatozoides de lince ibérico sobreviven a la criopreservación utilizando un protocolo de uso generalizado para espermatozoides de felinos; el diluyente de congelación TEST proporcionó mejores resultados que el diluyente Biladyl, y (f) los espermatozoides de lince ibérico congelados y descongelados son capaces de fecundar *in vitro* oocitos de gata doméstica, demostrándose, por tanto, que este es un método útil para evaluar la función espermática en el laboratorio.

Discusión General



Se calcula que la tasa actual de extinción de especies puede ser unas 1.000 veces superior que la tasa de extinción normal (histórica) estimada a partir del registro fósil (Wilson 1992, 2002). A diferencia de otros eventos de extinciones masivas ocurridos a lo largo de la historia de la Tierra éste que nos encontramos atravesando, definido como Crisis de Biodiversidad, se debe fundamentalmente a la acción humana, mediante la destrucción y fragmentación de hábitats y también, aunque en menor medida, por sobreexplotación directa de algunas especies. Aunque existan porciones disponibles de hábitat original, la pérdida de potenciales áreas de dispersión y el cierre de corredores migratorios (para algunas especies) genera poblaciones fragmentadas y, en algunos casos, aisladas. Cuando el tamaño de estas poblaciones cae por debajo del denominado tamaño mínimo de viabilidad (MVP), su recuperación es prácticamente imposible, de modo que este MVP es considerado normalmente como el umbral de extinción para una población o una especie (Frankham 1995). La estocasticidad demográfica, la estocasticidad ambiental y la pérdida de diversidad genética, que normalmente actúan en conjunto, tienden a reducir el tamaño de población y conducen a una especie que se encuentra por debajo del MVP hacia la extinción. Esta tendencia es conocida como el vórtice de extinción. La ausencia de flujo genético y el aumento de la consanguinidad, que ocurre en estas poblaciones pequeñas da lugar a una depresión por consanguinidad (Charlesworth y Charlesworth 1987) que se traduce en una reducción de la eficacia biológica de los individuos, mediante la disminución de la reproducción y la supervivencia y en limitaciones de la capacidad de adaptación y colonización de las poblaciones. En los machos se observa que los individuos más consanguíneos sufren una disminución drástica de la calidad del semen y como consecuencia una merma de su capacidad fecundante (Gomendio *et al.* 2000).

El lince ibérico, felino de mediano tamaño endémico de la península Ibérica a sufrido una contracción de su área de distribución histórica de casi el 50 % desde principios del siglo XX (Rodríguez y Delibes 2004) y una reducción del tamaño poblacional que sitúan a la especie al borde de la extinción, con aproximadamente 200 individuos en libertad (Guzmán *et al.* 2002) repartidos en dos poblaciones reproductivamente aisladas (sin flujo génico) en el sur de España. La especie, por tanto, se halla actualmente en un verdadero vórtice de extinción, situación ante la cual la acción de factores aleatorios podría conducirla a la desaparición.

La preservación del medio natural es prioritaria en casos como el del lince ibérico, pero el declive poblacional llega a tal punto que estas medidas, de ser posibles, no son suficientes y se hace necesario emprender, en paralelo, estrategias complementarias de conservación de la biodiversidad, entre ellas la cría en cautividad, los bancos de recursos

biológicos y el uso de biotecnologías reproductivas o técnicas de reproducción asistida (ARTs) (Roldán y Garde 2004).

La criopreservación de gametos, particularmente de espermatozoides maduros, constituye una herramienta fundamental para la conservación de la diversidad genética (Roldán y Gomendio 2009). Aunque algunos procedimientos de criopreservación de espermatozoides pueden servir para distintas especies, la criosensibilidad de los gametos es, en general, específica de especie y varía entre individuos (Leibo y Bradley 1999, Curry 2000, Holt 2000a, Yu *et al.* 2002, Tsutsui *et al.* 2003, Esteso *et al.* 2006, Leibo *et al.* 2007) lo que obliga a adecuar los procedimientos a cada una de las diferentes especies. Con el objetivo de optimizar los protocolos de criopreservación de espermatozoides en especies amenazadas se ha recurrido desde hace décadas al empleo de especies modelo (Wildt *et al.* 1986b, Pope 2000, Swanson 2003, Pukazhenthi *et al.* 2006a). Para llevar a cabo una adecuada criopreservación de espermatozoides es necesario considerar varios factores, algunos relacionados con los espermatozoides como su morfología o la integridad del acrosoma y otros relacionados con el proceso de congelación-descongelación, como el criodiluyente, el crioprotector y su concentración, las tasas de refrigeración, congelación y descongelación, el sistema de almacenamiento o el tiempo y temperatura de exposición de los espermatozoides al crioprotector.

El trabajo realizado para esta tesis ha tenido como objetivo iniciar el estudio de la biología reproductiva de la especie de felino más amenazada del mundo y sentar las bases de la criopreservación de espermatozoides de esta especie como herramienta de conservación complementaria a otras en marcha desde la perspectiva *in situ* y *ex situ*. La especie objetivo es por tanto el lince ibérico aunque se han empleado también otras especies de felinos como modelo. A través de los capítulos de la misma se han caracterizado los parámetros reproductivos masculinos y se ha abordado el estudio de algunos factores de la criopreservación espermática de tres especies de felinos, dos de ellas consideradas modelos, el gato doméstico (*Felis catus*. Capítulos 1 y 2) y el lince rojo (*Lynx rufus*. Capítulo 3), y el propio lince ibérico (*Lynx pardinus*. Capítulos 4 y 5). Se ha trabajado con espermatozoides epididimarios de gato doméstico por tratarse de un material accesible y del que poder obtener resultados (capítulo 1 y 2) extrapolables no sólo a espermatozoides epididimarios de lince ibérico (capítulo 4) sino también, con cautela, a espermatozoides eyaculados de dicha especie (capítulos 4 y 5), dado que según se afirma en algunos trabajos anteriores con gato doméstico (Tebet *et al.* 2006, Luvoni 2006) entre ambos tipos de espermatozoides no existen diferencias significativas de congelabilidad.

Dado que la criopreservación provoca un descenso en la proporción de espermatozoides móviles y con acrosoma intacto (Howard 1993, Swanson y Wildt 1997, Luvoni 2006) y que ambos parámetros son esenciales para el potencial fecundante de los

misimos (Howard 1993, Zambelli *et al.* 2006) se ha analizado el efecto de varias condiciones experimentales, por una parte, sobre dichos parámetros durante el proceso de congelación-descongelación-incubación y, por otra, sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides *in vitro* (capítulos 1, 3 y 5).

Los resultados presentados en el capítulo 1 muestran que alrededor de tres cuartas partes de la población de gatos domésticos de Madrid son teratospérmicos (producción de <40% espermatozoides morfológicamente normales; Howard *et al.* 1990). Se han observado diferencias interanuales, pero no estacionales, en los parámetros espermáticos de esta especie, por lo que no puede hablarse de estacionalidad reproductiva en los machos de gato doméstico en nuestra población, como se ha sugerido por otros investigadores (Blottner y Jewgenow 2007) para individuos que habitan en el norte de Europa, donde los cambios estacionales son más marcados. Tampoco se ha observado un incremento de la producción espermática en gatos teratospérmicos como se ha propuesto en trabajos anteriores (Neubauer *et al.* 2004).

De los factores que pueden afectar al proceso de criopreservación se ha encontrado que tienen un efecto significativo sobre la motilidad (SMI) o el % de espermatozoides con el acrosoma intacto el sistema de envasado (siendo mejor la conservación en pajuelas) y la congelación sobre vapores de nitrógeno (siendo mejor la congelación en 2 niveles). Estos resultados se deben probablemente a la tasa de congelación lograda en cada uno de estos casos, más lenta empleando pajuelas congeladas en dos niveles sobre vapores de nitrógeno que utilizando pajuelas congeladas en 1 nivel o píldoras sobre hielo seco.

El swim-up proporcionó valores de SMI a la descongelación significativamente mayores que los encontrados en muestras descongeladas y diluidas (control), pero no dio lugar a tasas de fecundación *in vitro* significativamente mayores que las obtenidas con la muestra control. Es posible que este resultado pueda deberse a que al influir en la fecundación otros factores críticos, como la integridad del acrosoma, la mejora de la proporción de espermatozoides móviles no resulta condición suficiente para incrementar la tasa de penetración y fecundación *in vitro* de los espermatozoides.

La suplementación con pentoxifilina en el medio que se empleaba para diluir los espermatozoides después de la descongelación de las suspensiones espermáticas no ha producido un incremento significativo de la motilidad espermática y tampoco ha generado tasas de fecundación significativamente mayores que las logradas por las muestras espermáticas control. Tal vez la concentración de estimulante utilizada (1 mM) ha sido baja y será necesario en el futuro examinar concentraciones mayores, ya que se ha demostrado que tiene un efecto dosis-dependiente (Stachecki *et al.* 1994) o examinar una combinación de inhibidores de fosfodiesterasa con análogos de cAMP.

El diluyente de congelación TEST ha demostrado ser mejor diluyente que el Biladyl para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico. El uso de TEST con un 4% de glicerol añadido en una etapa, empleando una tasa de refrigeración lenta ($0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$), y con almacenamiento de la suspensión espermática en pajuelas congeladas en 2 niveles sobre vapores de nitrógeno, permitió obtener una tasa de fecundación *in vitro* que no fue significativamente diferente de la obtenida con espermatozoides frescos.

En el capítulo 2 se ha constatado un efecto negativo del tiempo de almacenamiento en refrigeración de los epidídimos de gato doméstico durante varios días sobre la motilidad espermática. Se ha puesto en evidencia que cuanto menor es el intervalo entre la obtención de testículos/epidídimos del animal y la recolección y criopreservación de los espermatozoides, mejora la motilidad espermática incluso después de la criopreservación e incubación post-descongelación. El tiempo transcurrido entre la obtención de espermatozoides y su criopreservación no tiene efectos sobre la proporción de espermatozoides con morfología normal o acrosoma intacto, mostrando por tanto estos dos parámetros mayor resistencia al envejecimiento de los espermatozoides que la motilidad. Se considera muy importante extrapolar estos resultados al rescate de material reproductivo en especies amenazadas como el lince ibérico con el objetivo de poder recuperar y conservar este valioso material genético en las mejores condiciones para aumentar sus posibilidades de uso futuro mediante técnicas de reproducción asistida.

Se ha demostrado que para espermatozoides de gato doméstico provenientes de epidídimos conservados en refrigeración durante varios días resulta significativamente mejor para la motilidad y el % de acrosomas intactos post-criopreservación, una equilibración larga de los espermatozoides con el glicerol de 120 min, en comparación con una equilibración corta de 30 min. Este resultado puede deberse a que el efecto crioprotector del glicerol es mayor cuando se permite un contacto moderadamente prolongado de éste con los espermatozoides antes de la congelación. Dado que las diferencias significativas ocurren cuando las muestras proceden de epidídimos almacenados durante 72 h a 4°C antes de la extracción de los espermatozoides, cabe pensar que este efecto se vea potenciado por el tiempo de almacenamiento en el epidídimo.

Por último, la comparación de los resultados obtenidos en este estudio con los registrados en la literatura indican que se está empleando un protocolo eficaz de criopreservación espermática, al menos para espermatozoides epididimarios de gato doméstico. Se ha conservado una alta proporción de espermatozoides móviles y con acrosoma intacto después de la descongelación. Los datos de motilidad obtenidos son similares a los registrados en otros trabajos (Hay y Goodrowe 1993, Tittarelli *et al.* 2006) justo después de la recuperación de los espermatozoides de los epidídimos y también

después de la criopreservación. Los datos de integridad acrosómica post-descongelación son sustancialmente mayores que los dados en los mismos estudios previos (Hay y Goodrowe 1993, Lengwinat y Blottner 1994).

Según Pukazhenthí y colaboradores (2007) la principal fuerza determinante de la supervivencia espermática a la criopreservación es la calidad inicial de los espermatozoides, especialmente en lo que respecta a la morfología normal y la integridad del acrosoma. Los datos obtenidos en este estudio empleando espermatozoides de gato doméstico han permitido confirmar la importancia de la proporción de espermatozoides normales y la integridad estructural del acrosoma como predictores de la supervivencia espermática a la criopreservación, dado que se han encontrado relaciones positivas y significativas entre estos parámetros en la muestra en fresco y la motilidad e integridad acrosómica de la misma después de la descongelación (capítulo 1). Asimismo, se han encontrado relaciones positivas y significativas entre el % de espermatozoides mótils y el % de acrosomas intactos después de descongelar (capítulo 1).

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 demuestran que es posible recoger y criopreservar semen de lince rojo en cautividad. Se han caracterizado parámetros seminales de esta especie y se ha encontrado que varios parámetros son inferiores a los descritos para otros felinos de mediano tamaño como el ocelote (Stoops *et al.* 2007), el gato pescador (Thiangtum *et al.* 2006) o el serval (Pukazhenthí *et al.* 2002) y similares a los vistos en las otras especies de lince (Howard 1993, Jewgenow *et al.* 2006, capítulos 4 y 5). Se han observado diferencias significativas entre las características seminales de las muestras obtenidas en otoño y en primavera, indicativas de cierta estacionalidad reproductiva en los machos de esta especie, aunque estas diferencias no se ha puesto de manifiesto en el tamaño de los testículos. La funcionalidad de los espermatozoides de lince rojo criopreservados se ha evaluado mediante fecundación *in vitro* heteróloga con oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*. Los espermatozoides criopreservados en el diluyente de congelación TEST han proporcionado tasas de fecundación sustancialmente mejores que aquéllos conservados en Biladyl, pese a que apenas se encontraron diferencias en la motilidad espermática y en la proporción de acrosomas intactos post-descongelación entre ambos diluyentes. Este resultado es importante debido a que pone en evidencia la necesidad de utilizar pruebas funcionales para valorar los métodos de criopreservación. La causa de estas diferencias entre diluyentes puede estar en el Tes, que está presente en el TEST y no en el Biladyl; en la concentración de Tris, menor en el Biladyl que en el TEST; en los azúcares que se incluyen como componentes de los diluyentes, glucosa y fructosa, respectivamente; en el ácido cítrico añadido al Biladyl y no al TEST; en el pH, dos décimas superior en el TEST o en la osmolalidad, ligeramente superior en el Biladyl, dado que la concentración de yema de huevo (20%) y glicerol (4%) son las mismas en ambos casos.

Los resultados obtenidos en los capítulos 4 y 5 revelan que es posible recoger y criopreservar espermatozoides eyaculados de lince. Asimismo se han recuperado y criopreservado espermatozoides epididimarios de animales muertos por causas traumáticas o infecciosas. Se ha caracterizado por primera vez el eyaculado y otros aspectos de la biología reproductiva de los machos del lince ibérico y se han puesto de manifiesto cuestiones importantes en relación con el potencial reproductor de la especie, como el reducido tamaño de los testículos, el bajo nivel de testosterona circulante (en suero) y la limitada cantidad de espermatozoides en cada eyaculado en comparación con otros felinos de mediano tamaño, aunque dentro del rango de variación, incluso ligeramente superiores (en varios parámetros) a lo observado en el lince rojo y el lince boreal (Howard 1993, Jewgenow *et al.* 2006, capítulo 3). El semen de lince ibérico presenta además una alta proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas que permite calificarla como teratospérmica en términos generales y la sitúan en la parte más baja de la clasificación de los felinos atendiendo a la proporción de espermatozoides morfológicamente normales (Pukazhenth *et al.* 2006c) (Fig. 1), junto a otras especies de lince.

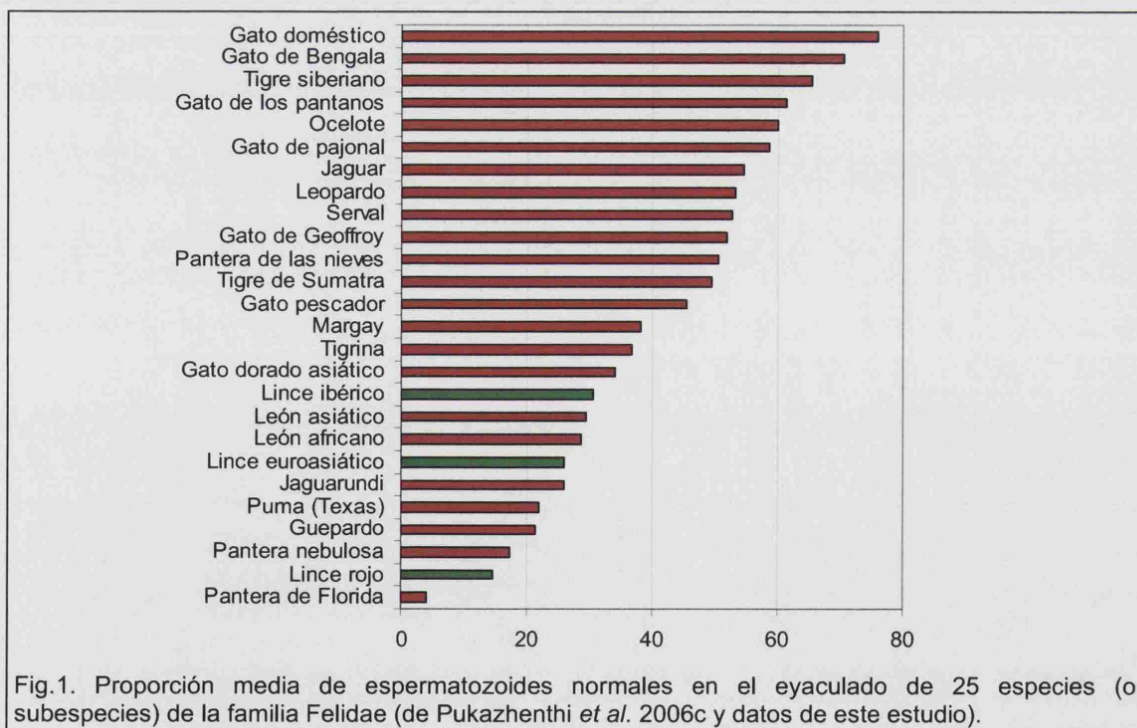


Fig.1. Proporción media de espermatozoides normales en el eyaculado de 25 especies (o subespecies) de la familia Felidae (de Pukazhenth *et al.* 2006c y datos de este estudio).

Los parámetros seminales del lince ibérico, y en particular la baja proporción de espermatozoides normales y los bajos niveles de testosterona circulante, probablemente estén relacionadas con los bajos niveles de variabilidad genética de esta especie (Gomendio *et al.* 2000). Estudios previos han encontrado relación entre variabilidad genética y las características reproductivas en los machos de otras especies de felinos salvajes como la

pantera de Florida (*Puma concolor coryi*; Barone *et al.* 1994), el guepardo (*Acinonyx jubatus*; Wildt *et al.* 1983, 1987b, Roth *et al.* 1995) y el león (*Panthera leo*; Wildt *et al.* 1987a). El pequeño tamaño relativo de los testículos podría estar relacionado con la reducida variabilidad genética, los bajos niveles de testosterona y la ausencia de competición espermática. Se han descartado factores ambientales como la disponibilidad de alimento, el estrés térmico o el nivel de precipitaciones como posibles moduladores de este carácter porque no se considera que estén actuando en el caso de los machos cautivos y no se han encontrado diferencias significativas entre éstos y los machos de vida libre para ninguno de los parámetros reproductivos analizados, incluido el tamaño de los testículos. Tampoco parece deberse a la estacionalidad reproductiva dado que no se han encontrado diferencias significativas entre los eyaculados obtenidos antes y después de la época reproductiva en otoño y primavera, respectivamente, aunque es necesario profundizar en este aspecto y obtener más información sobre cuáles son los valores seminales, testiculares y hormonales de los machos en el pico de la época reproductiva (enero) y durante el verano. No se ha podido estudiar el efecto de factores demográficos, sociales o comportamentales sobre este u otros parámetros reproductivos, lo cual también constituye una línea de investigación a desarrollar en el futuro dado que la densidad de conespecíficos, la abundancia de hembras o la presencia de otros machos cercanos (potenciales competidores) podrían estar actuando como moduladores y probablemente, interaccionado con todos o algunos de los otros factores mencionados anteriormente (Bronson 1985).

A la vista de los resultados obtenidos en animales mantenidos en cautividad, se observa la calidad seminal en el lince ibérico está claramente afectada por la edad, siendo los valores de la mayoría de parámetros espermáticos bajos en los animales <3 años. Los machos alcanzan la madurez reproductiva por encima de los 3 años de edad.

Se ha examinado la relación entre parámetros seminales y la fertilidad de los machos. Se ha encontrado relación significativa entre el % de espermatozoides con el acrosoma intacto y el éxito reproductor, expresado éste como el número de cachorros totales nacidos, de modo que los machos con mayor proporción de acrosomas intactos en el eyaculado producen mayor número de cachorros. También se ha observado una relación positiva entre el tamaño relativo de los testículos y el número total de espermatozoides en el eyaculado con el número de cópulas realizadas con la primera hembra. Estas relaciones podrían interpretarse como que los machos más competitivos tienden a maximizar la probabilidad de reproducirse generando mayor cantidad de espermatozoides y copulando más veces, al menos con la primera hembra con la que se aparean.

Los espermatozoides de lince ibérico sobreviven a la criopreservación cuando se emplea un protocolo de uso generalizado para espermatozoides de felinos. El diluyente TEST proporcionó significativamente mejores resultados de SMI post-descongelación que el

diluyente Biladyl. Estos espermatozoides criopreservados son capaces de fecundar *in vitro* oocitos de gata doméstica. La tasa de fecundación lograda por espermatozoides criopreservados en TEST fue el doble de la obtenida por los espermatozoides criopreservados en Biladyl, pero la diferencia no alcanzó la significación estadística, probablemente debido al pequeño número de machos disponibles para este trabajo. Se registraron marcadas diferencias entre las tasas de fecundación alcanzadas por los distintos machos de lince ibérico, lo cual coincide con registros previos que indican que las tasas de fecundación muestran un alto grado de variación entre machos (Howard y Wildt 1990, Donoghue *et al.* 1992a, b). Mediante la prueba de FIV heteróloga se ha demostrado también la capacidad fecundante de los espermatozoides epididimarios criopreservados de lince ibérico.

Se ha examinado la posible relación entre parámetros seminales y la capacidad fecundante de los espermatozoides en este ensayo *in vitro*. Se ha encontrado una relación positiva y significativa entre el porcentaje de fecundación *in vitro* heteróloga y el porcentaje de espermatozoides normales y también con el porcentaje de acrosomas intactos, similares a las relaciones encontradas usando ensayos de fecundación *in vitro* en otras especies (Amman y Hammerstedt 1993, Gadea 2005, Aitken 2006).

Todos estos resultados demuestran la validez de la fecundación *in vitro* heteróloga como prueba de capacidad fecundante en el lince ibérico y se constituye como un método a utilizar en el futuro para analizar en el laboratorio la funcionalidad de los espermatozoides de lince ibérico. Estos resultados serán de mucha utilidad en la medida que no sea posible realizar ensayos de fertilidad tales como inseminación artificial o fecundación *in vitro* homóloga.

Estos resultados son importantes porque representan la primera investigación detallada sobre la biología reproductiva del lince ibérico, especie críticamente amenazada, y constituyen la base de estudios futuros que nos permitirán profundizar en el conocimiento y desarrollar la aplicación de ARTs en esta especie.

Conclusiones



- Tres cuartos de la población de gatos domésticos de Madrid tiene una proporción de espermatozoides normales menor al 40% (teratospermia). Los gatos teratospérmicos no muestran un incremento de la producción espermática, contrariamente a lo encontrado por otros autores. No se ha observado estacionalidad en la calidad del semen.
- En la criopreservación de espermatozoides epididimarios obtenidos de gato doméstico, el diluyente de congelación (TEST o Biladyl), la tasa de refrigeración ($-0,5$ ó $-0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$), el añadido de glicerol en 1 ó 3 etapas y la carga de las pajuelas antes o después de la refrigeración no generan diferencias significativas a la descongelación ni en motilidad y en el % de espermatozoides con el acrosoma intacto.
- Para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato las pajuelas y el sistema de congelación en 2 niveles son significativamente mejores para el SMI que las píldoras y la congelación en 1 solo nivel.
- La criopreservación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico en TEST con 4% de glicerol añadido en una etapa, empleando una tasa de refrigeración lenta ($0,125^{\circ}\text{C}/\text{min}$), almacenando la suspensión espermática en pajuelas y congelando en dos niveles sobre vapores de nitrógeno, permite obtener tasas de fecundación *in vitro* que no difieren significativamente de las obtenidas con espermatozoides frescos. El TEST, por tanto, es un buen diluyente de congelación para espermatozoides epididimarios de esta especie.
- Un periodo prolongado de almacenamiento de los epidídimos disminuye la motilidad en el momento de la recuperación de los espermatozoides, indicando la importancia de la rapidez en la recuperación de los epidídimos después de la muerte del animal como parte del protocolo de rescate y criopreservación de espermatozoides epididimarios de felinos salvajes.
- Un periodo de 120 min de equilibrado de los espermatozoides y el glicerol es significativamente mejor para el mantenimiento de la motilidad y la integridad acrosómica durante la criopreservación que un periodo corto de 30 min.

- Es posible recoger y criopreservar semen de lince rojo cautivos. Las características seminales del lince rojo son inferiores a las de otros felinos de mediano tamaño y similares a las de otras especies de lince.
- Los mejores resultados de criopreservación de espermatozoides de lince rojo se obtienen con TEST con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol.
- La funcionalidad de los espermatozoides criopreservados de lince rojo puede evaluarse mediante fecundación *in vitro* heteróloga usando oocitos de gato doméstico madurados *in vitro*.
- Es posible recoger semen de lince ibérico cautivo y en libertad mediante electroeyaculación bajo anestesia general. Es posible también recuperar espermatozoides epididimarios viables de lince ibéricos muertos.
- Las características del semen de lince ibérico son inferiores a las de otros felinos de pequeño tamaño pero, en general, mejores que las de otras especies de lince.
- Los machos de lince ibérico alcanzan la madurez sexual plena cuando superan los 3 años de edad. No hay diferencias significativas en los parámetros espermáticos de animales cautivos y de vida libre, ni en la calidad seminal antes y después de la época reproductiva.
- Existe asociación significativa entre caracteres fenotípicos (peso relativo de testículos) y parámetros espermáticos (número total de espermatozoides, motilidad, integridad acrosómica) con el comportamiento reproductivo (número de cópulas) y la fertilidad masculinos (número de cachorros).
- Es posible criopreservar semen de lince ibérico. Los espermatozoides de lince ibérico sobreviven a la criopreservación utilizando un protocolo de uso generalizado para espermatozoides de felinos; el diluyente de congelación TEST proporcionó mejores resultados que el diluyente Biladyl.
- Los espermatozoides de lince ibérico congelados y descongelados son capaces de fecundar *in vitro* oocitos de gato doméstico, demostrándose, por tanto, que este es un método útil para evaluar la función espermática en el laboratorio.

Referencias bibliográficas



- Aisen E, Álvarez H, Venturino A, Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Aitken RJ. 2006. Sperm function tests and fertility. *J Androl* 29: 69-75.
- Aitken RJ, Bowie H, Buckingham D, Haskiss D, Richardson DW, West KM. 1992. Semen penetration into a hyaluronic acid polymers as a means of monitoring functional competence. *J Androl* 13: 44-54.
- Aitken RJ, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.
- Aitken RJ, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
- Aitken RJ, Koopman P, Lewis SEM. 2004. Seeds of concern. *Nature* 432: 48-52.
- Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. 1983. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl* 6: 180-193.
- Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60: 269-279.
- Alda F, Inogés J, Alcaraz L, Oria J, Aranda A, Doadrio I. 2008. Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack? *Anim Conserv* 11:297-305.
- Aldama JJ, Beltrán JF, Delibes M. 1991. Energy expenditure and prey requirements of free-ranging Iberian lynx in southwestern Spain. *J Wildl Mgmt* 55: 635-641.
- Atuna J. 1980. Hallazgo de un lince nórdico (*Lynx lynx* L. Mammalia) en la sima de Pagolusieta, Gorjea (Vizcaya). *Munibe* 3-4: 317-322.
- Álvarez J y Storey B. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232-241.
- Amann RP, Hammersted RH. 1993a. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fert Dev* 5: 361-381.
- Amann RP, Hammersted RH. 1993b. *In vitro* evaluation of sperm interaction quality: an opinion. *J Androl* 14: 397-406.
- Andrews JC, Howard JG, Bavister BD, Wildt DE. 1992 Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and Leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol Reprod Dev* 31: 200-207
- Aronson LR, Cooper ML. 1967. Penile spines of domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anat Rec* 157: 71-78.
- Axnér E. 2006. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66: 14-24.
- Axnér E, Forsberg CL. 2007. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Dom Anim* 42: 282-291.
- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 84:179-91.
- Barone MA, Roelke M, Howard JG, Brown JL, Anderson AE, Wildt DE. 1994. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America and North American Zoos. *J Mammalogy* 75: 150-162.
- Bartels P, Lubbe K, Kilian I, Friedmann Y, van Dyk G, Mot-timer D. 2000. *In vitro* maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology* 53: 195-522.
- Baudi DLK, Jewgenow K, Pukazhenth B, Spercoski KM, Santos AS, Reghelin ALS, Candido, MV, Javorouski ML, Müller G, Morais RN. 2008. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive *in vitro* binding assay in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 69: 204-211.
- Bekoff M, Daniels TJ, Gittleman JL. 1984. Life history patterns and the comparative social ecology of carnivores. *Ann Rev Ecol Syst* 15: 191-232.
- Beltrán JF, Rice JE, Honaycutt RL. 1996. Taxonomy of the Iberian lynx. *Nature* 379: 407-408.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanism of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73: 1338-1344.
- Bernard RTF, Stuart CT. 1987. Reproduction of the caracal (*Felis caracal*) from the Cape Province of South Africa. *S Afr J Zool* 22: 177-182.
- Berlinguer F, González R, Succu S, Del Olmo A, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M, Ledda S, Roldan ERS. 2008. *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology* 69: 349-359.

- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57: 1105-22.
- Bisset C, Bernard RTF. 2005. The effect of prolonged cold storage of eland (*Taurotragus oryx*) cauda epididymides on the spermatozoa: possible implications for the conservation of biodiversity. *Theriogenology* 63:1592-1604.
- Blanco JC. 1998. Lince ibérico (*Lynx pardinus*). En: Mamíferos de España. Vol. I. Geoplaneta. Barcelona. España. pp. 339-345.
- Blotner S, Jewgenow K. 2007. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Dom Anim* 42: 536-540.
- Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A, Pau S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 56:955-67.
- Bonney RC, Moore HDM, Jones DM. 1981. Plasma concentration of oestradiol-17 β and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (*Felis concolor*) during oestrus, pseudopregnancy. *J Reprod Fert* 63: 523-531.
- Bowen RA. 1977. Fertilization *in vitro* of feline ova by spermatozoa from ductus deferens. *Biol Reprod* 17: 144-147.
- Bronson FH. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod* 32, 1-26.
- Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM. 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology* 63:458-469.
- Brown LB, Graham LH, Wu JM, Collins D, Swanson WF. 2002. Reproductive endocrine responses to photoperiod and exogenous gonadotropins in the Pallas' cat (*Otocolobus manul*). *Zoo Biol* 21: 347-364.
- Brown JL, Wildt DE, Phillips LG, Seidensticker J, Fernando SBU, Miththapala S, Goodrowe KL. 1989. Adrenal-pituitary-gonadal relationships and ejaculate characteristics in captive leopards (*Panthera pardus kotiya*) isolated on the island of Sri Lanka. *J Reprod Fert* 85: 605-613.
- Byers AP, Hunter AG, Seal US, Binezik GA, Graham EF, Reind NJ, Tilson RL. 1989. In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). *J Reprod Fert* 86: 599-607.
- Byers AP, Hunter AG, Seal US, Graham EF, Tilson RL. 1990. Effect of season on seminal traits and sperm hormone concentrations in captive male Siberian tigers (*Panthera tigris*). *J Reprod Fert* 90, 119-125.
- Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queiroz AI, Rogado L, Santos-Reis ME. 2005. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto de Conservação da Natureza. Lisboa.
- Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M, Rodan ERS. 1998. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorr*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). *J Reprod Fert* 113: 35-45.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 237-268.
- Charlesworth B, Charlesworth D. 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res* 74: 329-340.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axné E. 2008. Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. En prensa.
- Chatdarong K, Axné E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. 2007. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 68:1326-1333.
- Cohen J, Felten P, Zeilmaker GH. 1981. *In vitro* fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedure. *Fertil Steril* 36: 356-362.
- Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhethi BS. 2006. *In vitro* development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1659-1663.
- Crespo C, Ganán N, Pulido L, Osuna G, Gomendio M, Roldán ERS. 2007. Conservación de tejidos y células de lince ibérico (*Lynx pardinus*), lince boreal (*L. lynx*) y lince rojo (*L. rufus*) para el establecimiento de un banco de recursos genéticos. *Galemys* 19: 3-15.
- Crosier AE, Pukazhenthil BS, Henghali JN, Howard JG, Dickman AJ, Marker L, Wildt DE. 2006. Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. *Cryobiology* 52: 169-181.
- Crowe DM. Aspects of ageing, growth, and reproduction of bobcat from Wyoming. *J Mamm* 1975: 177-198.

- Curry M. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5: 46–52.
- de Lamirande E, Gagnon C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10 (Suppl. 1):15-21.
- del Olmo A, Gañan N, Malo AF, Gomendio M, Roldan ERS. 2005. Obtención y congelación de espermatozoides epididimarios de visón americano (*Mustela vison*) como modelo para el visón europeo (*Mustela lutreola*). VII Jornadas de la Sociedad Española de Conservación y el Estudio de los Mamíferos, Valencia 3-6 Diciembre.
- Delibes M. 1979. Le Lynx dans la Péninsule Iberique: repartition et regresion. Predation. *Bull mens Off Nation Chasse. N Sp Scien Tech. Le Lynx*. pp. 41-55.
- Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. 2000. Is stress really all that important? *Theriogenology* 55: 65-73.
- Dobson H, Smith RF. 2001. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 60-61: 743-752.
- Donoghue AM, Howard JG, Byers AP, Goodrowe, KL, Bush M, Blumer E, Lukas J, Stover J, Snodgrass K, Wildt DE. 1992a. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod* 46: 1047-1056.
- Donoghue AM, Johnston LA, Seal US, Armstrong DL, Simmons LG, Gross T, Tilson RL, Wildt DE. 1992b. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 96: 555-564.
- Donoghue AM, Johnston LA, Seal, U.S., Armstrong, D.L., Tilson, R.L., Wolf, P., Petrini, K., Simmons LG, Gross T, Wildt, DE. 1990. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.* 43, 733-744.
- Dresser BL, Kramer L, Reece B, Russel PT. 1982. Induction of ovulation and successful artificial insemination in a Persian leopard (*Panthera pardus saxicolor*). *Zoo Biol* 1: 55-57.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265:432-7.
- Eilts BE. 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology* 64: 692-697.
- Esteso MC, Soler AJ, Fernández-Santos M, Quintero-Moreno AA, Garde JJ. 2006. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl* 27: 662-670.
- Farstad W. 2000. Current state of biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61: 375-387.
- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after first cleavage. *J Androl* 27: 176-188.
- França LR, Godinho CL. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cat (*Felis catus*). *Biol Reprod* 68: 1554-1561.
- Fernández N, Palomares F, Delibes M. 2002. The use of breeding dens and the kitten development in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J Zool* 258: 1-5.
- Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, De Causmaecker V, Dewulf J, Pope CE, Van Soom A. 2008. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology* 70: 1550-1559.
- Frankham R 1995 Effective population size / adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet Res* 66: 95-107.
- Fraser LR. 1990. Sperm capacitation and its modulation. En: *Fertilization in Mammals*. Bavister BD, Cummins, Roldan ERS (Eds.). Sero Symposium. USA. pp. 141-153.
- Friedmann Y, Lubbe K, Kilian I, Grobler DG, Denniston RS. 2000. Changes in motility and morphological characteristics of African buffalo (*Syncerus caffer*) sperm during storage of the epididymis. *Theriogenology* 53: 332.
- Fuchs B, Jakop U, Göritz F, Hermes R, Hildebrandt T, Schiller J, Müller K. 2009. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology* 71: 568-575.
- Fukuda M, Morales P, Overstreet JW. 1989. Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 24: 59-65.
- Gadea J. 2005. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology* 63, 431-444.
- Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod* 49: 112-123.

- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser SJ. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10: 1109-1122.
- García-Perea R. 1992. New data on the systematics of lynxes. *Cat News* 16: 15-16.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhor* and *G. dorcas neglecta*). *Biol Reprod* 69: 602-611.
- Garde JJ, Gomendio M, Espeso G, Roldan ERS. 2006a. Live birth of a Mohor gazelle (*Gazella dama mhor*) calf following intrauterine insemination with frozen-thawed semen. *Reprod Fert Dev* 18: 210.
- Garde JJ, Martínez-Pastor F, Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, García AJ, Anel L, Roldán ERS. 2006b. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod Dom Anim* 41 (Suppl. 2): 93-102.
- Garzón J. 1978. Die situation des luchs in Spanien. En: *Der Luchs in Europa-Verbreitung, Wiedereinbürgerung, Räuber – Beute- Beziehung*.
- Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal for human spermatozoa. *Hum Reprod* 12:112-8.
- Glover TE, Watson PF. 1985. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 24:449-56.
- Gomendio M, Cassinello J, Roldan ERS. 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc Roy Soc B* 267: 875-882.
- Gomendio M, Harcourt AH, Roldan, ERS. 1998. Sperm competition in mammals. En: *Sperm Competition and Sexual Selection*. Birkhead TR, Moller AP (Eds). Academic Press, London. pp. 667-751.
- Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ERS. 2007. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134:19-29.
- Gómez MC, Pope E, Harris R, Mikota S, Dresser BL. 2003. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 60: 239-251.
- González R, Berlinguer F, Espeso G, Ariu F, Del Olmo A, Garde JJ, Gomendio M, Ledda S, Roldan ERS. 2008. Use of a neuroleptic in assisted reproduction of the critically endangered Mohor gazelle (*Gazella dama mhor*) *Theriogenology* 70: 909-922.
- Goodrowe KL. 1992. Feline reproduction and artificial breeding technologies. *Anim Reprod Sci* 28: 389-397.
- Goodrowe KL, Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 40:967-75.
- Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. 1989a. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in-vitro fertilisation. *J Reprod Fert Suppl.* 39: 73-90.
- Goodrowe KL, Miller AM, Wildt DE. 1989b. *In vitro* fertilization of gonadotropin-stimulated leopard cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J Exp Zool* 252: 89-95.
- Goodrowe KL, Walker SL, Ryckman DP, Mastromonaco GF, Hay MA, Bateman HL, Waddell WT. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. 2000. *Anim Reprod Sci* 60-61: 389-403.
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 39: 335-372.
- Grossmann M, Santaló J. 1991. Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol* 42:87-108.
- Guzmán López-Ocón JN, García González FJ, Garrote Alonso G, Pérez de Ayala Balzola R, Iglesias Llamas C. 2002. El Lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Censo-diagnóstico de sus poblaciones. Ministerio de Medio Ambiente.
- Haas van Dorsser FJ, Strick JA. 2005. Semen characteristics and sperm morphology in the Arabian leopard (*Panthera pardus nimr*) and how these vary with age and season. *Reprod Fert Dev* 17: 675-682.
- Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Hamner CL, Jennings LL, Sojka NJ 1970. Cat (*Felis catus*) spermatozoa require capacitation. *J Reprod Fertil* 23:477-80.
- Harcourt AH, Purvis A, Liles L. 1995. Sperm competition mating system not breeding season affects testes size of primates. *Funct Ecol* 9: 468-476.

- Hardy WD. 1984. Feline leukemia virus as an animal retrovirus model for the human T-cell leukemia virus. En: Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus. Gallo R, Essex M, Gross L (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Harris RF, Pope CE, Gómez MC, Leibo SP, Dresser BL. 2001. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology* 55: 308.
- Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88: 343-352.
- Hay MA, Goodrowe KL. 1993. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert Suppl.* 47: 297-305.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril* 60: 911-918.
- Hermansson U, Axnér E. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology* 67: 1239-1248.
- Hewitt DA, England GCW, Beekman SPA. 2001. Cryopreservation of gametes and embryos of canidae and felidae. En: Cryobanking the Genetic Resource, Watson PF, Holt WV (Eds.). CRC Press, USA. pp. 361-390.
- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59: 813-820.
- Holt WV. 2000a. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- Holt WV. 2000b. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- Holt WV, Pickard AR. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 4: 143-150.
- Howard JG. 1992. Feline semen analysis and artificial insemination. En: Kirk's Current Veterinary Therapy. XI Small animal practice. Kirk-Bonagura (Eds.). Philadelphia, pp. 929-934.
- Howard JG. 1993. Semen collection and analysis en carnivores. En: Zoo and Wild Animal Medicine III. Fowler ME (Ed.). Saunders WB Co. Philadelphia, pp. 390-399.
- Howard JG. 1999. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. En: Zoo and Wildlife Medicine: Current Therapy IV. Fowler ME y Miller RE (Eds.). Saunder WB Co., Philadelphia. pp. 449-457.
- Howard JG, Barone M, Bush M. 1991. A heterologous salt-stored zonae pellucidae assay for assessing sperm capacitation and the impact of teratospermia in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Proc Annu Meet Am Soc Androl* 101.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. 1990. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 11: 204-215.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. 1986. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. En: Current Therapy in Theriogenology II. Morrow D (Ed.). Saunders WB Co. Philadelphia, pp. 1047-1053.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J Androl* 12: 36-45.
- Howard JG, Munson L, McAloose D. 1993. Comparative evaluation of seminal, vaginal and rectal bacterial flora in the cheetah and domestic cat. *Zoo Biol* 12: 81-96.
- Howard JG, Wildt DE. 1990. Ejaculate-hormonal characteristics in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by *in vitro* penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Dev* 26: 163-174.
- Howard JG, Wildt DE. 2009. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 71: 130-148.
- Inskip C, Zimmermann A. 2009. Human-felid conflict: a review of patterns and priorities worldwide. *Oryx* 43: 18-34.
- ISIS (International Species Information System). <www.isis.org> 2008.
- IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Descargado el 6 de Diciembre de 2008.
- Jahnel F. 1938 Über die widerstandsfähigkeit von verschlichenen spermatozoen gegenüber starker Kälte. *Klein Wochenschr* 17: 1273-1274.
- Jewgenow K, Blottner S, Lengwinat T, Meyer HHD. 1997. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *J Reprod Fert (Suppl)* 51: 33-39.
- Jewgenow K, Goeritz F, Neubauer K, Fickel J, Naidenko S. 2006. Characterization of reproductive activity in captive male Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Eur J Wild Res* 52: 34-38.

- Jewgenow K, Neubauer K, Blotner S, Schön J, Wildt DE, Pukazhenthi BS. 2009. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. *J Androl*. En prensa.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. 1992. The hyposmotic swelling test: an update. *Arch Androl* 29: 105-116.
- Johnson LA, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. 1996. Staining sperm for viability assessment. *Reprod Dom Anim* 31: 37-47.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slatery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ. 2006. The Late Miocene radiation of modern Felidae: A genetic assessment. *Science* 6: 73 – 77.
- Johnson WE, Godoy JA, Palomares F, Fernandes M, Revilla E, O'Brien SJ. 2004. Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *J Hered* 95: 19-28.
- Johnson WE, O'Brien SJ. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J Mol Evol* 44: 98-116.
- Johnston LA, Armstrong DL, Brown JL. 1994. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). *J Reprod Fert* 102: 229-236.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. 1991. Rescue and maturation *in vitro* of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biol Reprod* 45: 898-906.
- Jordan HL, Howard JG, Sellon RK, Wildt DE, Tompkins WA, Kennedy-Stokopf S. 1996. Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. *J Virol* 70: 8224–8228.
- Junta de Andalucía. 2008a. Boletín Gato Clavo. Programa Life 2006-2001. Conservación y reintroducción del lince ibérico en Andalucía. Gato clavo 10, Enero, www.lifelince.org.
- Junta de Andalucía. 2008b. Boletín Gato Clavo. Programa Life 2006-2001. Conservación y reintroducción del lince ibérico en Andalucía. Gato clavo 11, Febrero, www.lifelince.org.
- Junta de Andalucía. 2008c. Boletín Gato Clavo. Programa Life 2006-2001. Conservación y reintroducción del lince ibérico en Andalucía. Gato clavo 12, Marzo, www.lifelince.org.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiz P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60: 1249-1259.
- Kashiwazaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa E, Kojima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Shino M. 2005. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Dev* 51: 735-739.
- Keller LF, Grant PR, Grant BR, Petren K. 2002. Environmental conditions affects the magnitude of inbreeding depression in survival of Darwin's finches. *Evolution* 56: 1229-1239.
- Kenagy GJ, Trombulak SC. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J Mamm* 67: 1-22.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50: 615-623.
- Kilian I, Lubbe K, Bartels P, Friedmann Y, Denninston RS. 2000. Evaluating epididymal sperm of African wild ruminants: longevity when stored at 4°C and viability following cryopreservation. *Theriogenology* 53: 336.
- Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J Reprod Fert* 116: 217-222.
- Kurtén B. 1978. The lynx from Etouaries, *Lynx issidorensis* (Croizet y Jobert), late Pliocene. *Ann Zool Fennici* 15: 314-322.
- Kurtén B, Grandqvist E. 1987. Fossil pardel lynx (*Lynx pardina spelatea* Boule) from a cave in southern France. *Ann Zool Fennici* 24: 39-43.
- Larivière, S., and Walton L.R. Lynx rufus. *Mammalian species* 1997; 563, 1-8.
- Larson JL, Miller DJ. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 52: 445-449.
- Larsson B, Rodriguez-Martínez H. 2000. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci* 60-61: 327-336.
- Lasley BL, Loskutoff NM, Anderson, G.B. 1994. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. *Theriogenology* 41: 119-132.
- Lessells CM, Boag PT. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116-121.
- Leibo SP, Bradley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. En: *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Gagnon C (Ed.). Cache River Press. Vienna. pp. 501-516.

- Leibo SP, Kubisch HM, Schramm RD, Harrison RM, VandeVoort CA. 2007. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. *J Med Primatol* 36: 151-63.
- Leibo SP, Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57: 303-326.
- Lengwinat T, Blottner S. 1994. *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 35: 291-301.
- Lewis SEM, Aitken RJ. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322: 33-41.
- Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. 2008. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fert Steril* 90: 352-359.
- Loskutov NM, Simmons HA, Goulding M, Thompson G, Jongh TD, Simmons LG. 1996. Species and individual variation in cryoprotectant toxicities and freezing resistance of epididymal sperm from African antelope. *Anim Reprod Sci* 42: 527-535.
- Lubbe K, Bartels P, Kilian I, Friedmann Y, Godke RA. 2000. Comparing motility and morphology of horse, zebra and rhinoceros epididymal spermatozoa when cryopreserved with two different cryodiluents or stored at 4°C. *Theriogenology* 53: 338.
- Luvoni GC. 2006. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66:101-111.
- Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S, Ruggiero C. 2003a. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg* 5: 203-208.
- Luvoni GC, Kalchschmidt, Marinoni G. 2003b. Conservation of feline semen. Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. *J Feline Med Surg* 5: 257-263.
- MacArthur RH, Wilson EO. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton Landmarks in Biology. Princeton University Press, Princeton, US. pp. 224.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Gomendio M, Roldan ERS. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 72: 822-829.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. En: *Spermatology*. Roldan ERS y Gomendio M (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 217-228.
- Mantegazza P. 1866. *Gli amori degli uomini. Saggio di una etnologia dell'amore*. 2 vols. Milano: Paolo Mantegazza Editore.
- Martínez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, Herraes P, de Paz P, Anel L. 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63: 24-40.
- Martins CF, Driessen K, Melo Costa P, Carvalho-Neto JO, de Sousa RV, Rumpf R, Dode MN. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Anim Reprod Sci*. En prensa.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
- Mazur P, Schneider U. 1986. Osmotic response of preimplantation Mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys* 8: 259-285.
- McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fert* 95: 527-534.
- Meli ML, Cattori V, Martínez F, López G, Vargas A, Simón MA, Zorrilla I, Muñoz A, Palomares F, López-Bao JV, Pastor J, Tandon R, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. 2009. Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS ONE* 4: e4744.
- Menotti-Raymond M, Davis VA, Chen ZQ, Menotti KA, Sun S, Schaffer AA. 2003. Second-generation integrated genetic linkage/radiation hybrid maps of the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered* 94: 95-106.
- Merlo B, Iacomo E, Zambelli D, Belluzzi S. 2005. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* 63: 2032-2039.
- Miller AM, Roelke ME, Groggowe KL, Howard JG, Wildt DE. 1990. Oocyte recovery, maturation and fertilization *in vitro* in the puma (*Felis concolor*). *J Reprod Fert* 88: 249-258.
- Minter LJ, Pinto CRF, Davis M, Kozink DM. 2007. Influence of extender and packaging on post-thaw survival of epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 68: 501-502.
- Morais RN, Mucciolo RG, Gomes MLF, Lacerta O, Moraes W, Moreira N, Gram LH, Swanson WF, Brown JL. 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal

- androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57: 2027-2041.
- Morato RG, Conforti VA, Azevedo FC, Jacomo ATA, Silveira L, Sana D, Nunes ALV, Gimaraes MABV, Barnabe RC. 2001. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction* 122: 745-751.
- Morato RG, Verrreschi ITN, Guimaraes MABV, Cassaro K, Pessuti C, Barnabe RC. 2004. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology* 61: 1273-1281.
- Nakagata T, Takeshima T. 1993. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1-hybrid strains. *Exp Anim* 42: 317-320.
- Nelson KL, Crichton EG, Doty L, Volenec DE, Morato RG, Pope CE, Dresser BL, Brown CS, Armstrong DL, Loskutoff NM. 1999. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology* 51: 290.
- Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenthi B. 2004. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biol Rep* 71: 1517-1524.
- Niwa K, Óharea K, Hosoi Y, Iritani A. 1985. Early events of *in vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert* 74: 657-660.
- Nowell K, Jackson P. 1996. Wild Cats: Status Survey and and Conservation Action Plan. (IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland, Switzerland).
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. 2002. The feline genome project. *Ann Rev Genet* 36: 657-686.
- O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann JF, Bush M, Wildt DE. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227: 1428-1434.
- Palomares F. 2004. ¿Cual es la situación real de las poblaciones de lince? En: Los Retos Medioambientales de Siglo XXI. La conservación de la Biodiversidad en España. Gomendio M (Ed.) Fundación BBVA. Madrid. pp. 63-75.
- Palomares F, Delibes M, Revilla E, Calzada J, Fedriani JM. 2001. Spatial ecology of the Iberian lynx and abundance of European rabbit in southwestern Spain. *Wildl. Monogr* 148: 1-36.
- Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Jonson WE. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11: 2171-2182.
- Palomares F, Revilla E, Calzada J, Fernández N, Delibes M. 2005. Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biol Conserv* 122: 53-69.
- Parkinson TJ, Whitfield CH. 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27: 781-797.
- Parks JE. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. En: Reproductive Tissue Banking. Scientific Principles. Karow AM, Critser JK (Eds.), San Diego, CA: Academic Press. pp. 229-261.
- Pérez de Albéniz J. 2006. El Lince Ibérico. Una Batalla por la Supervivencia. Lynx Editorial. Bellaterra.
- Pertoldi C, García-Perea R, Godoy JA, Delibes M, Loeschcke V. 2006. Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J Zool (Lond)* 268:73-86.
- Pickett BW, Amann RP. 1993. Cryopreservation of Semen. En: Equine Reproduction. McKinnon AO y Voss JL (Eds), Lea & Febiger, Philadelphia, PA. pp 769-789.
- Pineda MH, Dooley MS. 1984. Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of ejaculates of the domestic cat. *Am J Vet Res* 45: 1520-1525.
- Platz CC, Follis T, Demorest N, Seager SW. 1976. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. *Proceedings of VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*: 1053-1056.
- Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fert* 52: 279-282.
- Pocock G, Richards CD. 2005. Fisiología humana: La base de la Medicina. Masson. 712 pp.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53: 163-174.
- Pope CE, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL, Maruska EJ, Dresser BL. 1989. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian desert cat (*Felis silvestris ornata*) to the domestic cat (*Felis domestica*) following *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 40 (Suppl 1): 61.

- Pope CE, Gomez MC, Davis AM, Harris, RF, Mikota, SK, Boyd EH, Dresser BL. 2001. Oocyte retrieval, *in vitro* fertilization and embryo transfer in the caracal (*Caracal caracal*). *Theriogenology* 55: 397.
- Pope CE, Gomez MC, Dresser BL. 2006a. *In vitro* embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology* 66: 1518-1524.
- Pope CE, Gómez MC, Dresser BL. 2006b. *In vitro* production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology* 66: 59-71.
- Pope CE, Keller GL, Dresser BL. 1993. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*, cryopreservation and successful intra-and interspecies embryo transfer. *J Reprod Fert (Suppl.)* 47: 189-201.
- Pope CE, Turner JL, Quatman SP, Dresser BL. 1991a. Semen storage in the domestic felid: a comparison of cryopreservation methods and storage temperature. *Biol Reprod* 44 Suppl: 117.
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. 1991b. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med* 22: 87-95.
- Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico. www.lynxexsitu.es
- Programa de conservación Ex-situ del Lince Ibérico. 2008. Informe sobre la temporada de cría 2008. www.lynxexsitu.es
- Provost EE, Nelson CA, Marshall AD. 1973. Population dynamics and behaviour in the bobcat. En: *The World's Cats I*. World Wildl Safari, Winston (US). pp. 42-67.
- Pukazhenthi B, Cornizzoli P, Travis AJ, Wildt DE. 2006a. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fert Dev* 18: 77-90.
- Pukazhenthi B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelican KM, Bush M, Howard JG, Wildt DE. 2006b. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1790-1796.
- Pukazhenthi B, Neubauer K, Jewgenow K, Howard JG, Wildt DE. 2006c. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 66: 112-121.
- Pukazhenthi B, Noiles E, Pelican K, Donoghue A, Wildt DE, Howard JG. 2000. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* 40: 139-150.
- Pukazhenthi B, Pelican K, Wildt DE, Howard JG. 1999. Sensitivity of the domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol Reprod* 61: 135-141.
- Pukazhenthi B, Santymire R, Crosier A, Howard JG, Wildt DE. 2007. Challenges in cryopreserving endangered mammal spermatozoa: Morphology and the value of acrosomal integrity as markers of cryo-survival. En: *Spermatology*. Roldan ERS y Gomendio M (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 433-446.
- Pukazhenthi B, Spindler R, Wildt DE, Bush LM, Howard JG. 2002. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology* 44: 288-300.
- Pukazhenthi BS, Wildt DE. 2004. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod Fert Dev* 16, 33-46.
- Pukazhenthi B, Wildt DE, Howard JG. 2001. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fert Suppl.* 57: 423-433.
- Ralls K, Ballou JD. 1986. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 19-22.
- Robaire B. 1999. Fifty years of insight into the seminiferous epithelium: A tribute to Yves W. Clermont. En: *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Gagnon C (Ed.). Cache River Press. Vienna. IL. pp. 1-4.
- Rodríguez A. 2007. *Lynx pardinus* (Temminck, 1827). En: *Atlas y libro rojo de los mamíferos de España*. Palomo LJ, Gisbert J y Blanco JC (Eds.) Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid, España. pp. 342-344.
- Rodríguez A, Delibes M. 1990. El lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España. Distribución y problemas de conservación. ICONA, Madrid.
- Rodríguez A, Delibes M. 2002. Internal structure and patterns of contraction in the geographic range of the Iberian lynx. *Ecography* 25: 314-328.
- Rodríguez A, Delibes M. 2003. Population fragmentation and extinction in the Iberian Lynx. *Biol Conserv* 109: 321-331.
- Rodríguez A, Delibes M. 2004. Patterns and causes of non-natural mortality in the Iberian Lynx during a 40-year period of range contraction. *Biol Conserv* 118: 151-161.
- Roldan ERS, Gañán N, Crespo C, González R, Arregui L, del Olmo A, Garde JJ, Gomendio M. 2006a. A genetic resource bank and assisted reproductive techniques for the Iberian lynx. En: *Iberian*

- Lynx Ex-situ Conservation. Fundación Biodiversidad; Madrid: Ministerio de Medio Ambiente. www.lynxexsitu.es. pp. 101-105.
- Roldan ERS, Garde JJ. 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En: Los Retos Medioambientales del Siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España. Gomendio M (Ed.). CSIC-Fundación BBVA. Madrid. pp. 283-303.
- Roldan ERS, Gomendio M. 2009. Sperm and conservation. En: Sperm Biology. Birkhead TR, Hosken D, Pitnick S (Eds), Academic Press, London, pp. 539-564.
- Roldan ERS, Gomendio M, Garde J, Espeso G, Ledda S, Berlinguer F, Del Olmo A., Soler AJ, Arregui, Crespo C, Gozalez R. 2006b. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organisation of genetic resource banks. *Reprod Dom Anim* 41 (Suppl. 2): 82-92.
- Roth TL, Bush, L.M; Wildt DE, Weiss RB. 1999. Scimitar horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine *in vitro* fertilization system after cryopreservation system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen. *Biol Reprod* 60: 493-498.
- Roth TL, Howard JG, Donoghue AM, Swanson WF, Wildt DE. 1994. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa *in vitro*. *J Reprod Fert* 101: 563-569.
- Roth TL, Swanson WF, Blumer E, Wildt DE. 1995. Enhancing zona penetration by spermatozoa from a teratospermic species, the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Exp Zool* 271: 323-330.
- Root M, Johnston S, Olson P. 1995. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 31: 429-433.
- Sabater A. 2001. El lince Ibérico. EGMASA. Sevilla.
- Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J Androl* 23: 737-752.
- Salamon S, Maxwell WCM. 1995. Frozen storage of ram semen II: Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38: 1-36.
- Sánchez-Partida L, Setchell B, Maxwell W. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fert Dev* 9: 689-696.
- Santiani A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis de Maestría en Ciencias. Temuco, Chile: Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera.
- Say L, Portier D. 2006. What determines testis size in the domestic cat (*Felis catus*)? *Biol Lett* 43: 41-49.
- Schmehl ML, Graham EF. 1989. Ultrastructure of tom cat (*Felis domestica*) and tiger (*Panthera tigris altaica*) spermatozoa. *Theriogenology* 31: 87-95.
- Setchell BP. 1992. Domestication and reproduction. *Anim Reprod Sci* 28: 195-202.
- Shettles LB. 1940. The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures. *Am J Physiol* 128: 408.
- Siemieniuch M, Dubiel A. 2007. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci* 99: 135-144.
- Siemieniuch MJ, Woclawek-Potocka I. 2008. Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (*Felis catus* s. *domestica*, L. 1758) sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser. *Reprod Dom Anim* 43: 633-637.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.
- Silva AR, Morato RG, Silva LDM. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 159-175.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fert Steril* 80: 1420-1430.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE. 1970. Artificial insemination in the cat. *Lab Anim Care* 20:198-204.
- Soler AJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Garde JJ. 2005. Characteristics of Iberian deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64: 1503-1517.
- Soler AJ, García AJ, Fernández-Santos M, Estes MC, Garde JJ. 2003a. Effects of thawing procedure on postthawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J Androl* 24: 746-756.
- Soler AJ, Pérez-Guzman MD, Garde JJ. 2003b. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: Effect on sperm motility, viability and morphological integrity. *J Exp Zool* 295A: 188-199.

- Songsasen N, Tong J, Leibo S. 1998. Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J Exp Zool* 280: 189-196.
- Spallanzani L. 1776. Opuscoli di fiscal. Animale e vegetabile, opuscola. II. Oservazioni e spermienze intorno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animale. Modena, Italy.
- Spindler R, Wildt DE. 1999. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod* 61: 188-194.
- Stachecki JJ, Ginsburg KA, Armant DR. 1994. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine. *J Androl* 15, 157-164.
- Stachecki JJ, Ginsburg KA, Leach RE, Armant DR. 1993. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J Androl* 14: 60-65.
- Stewart DL. 1951. Storage of bull spermatozoa at low temperature. *Vet Rec* 63: 65-66.
- Stoops MA, Bond JB, Bateman HL, Campbell MK, Levels GP, Browsher TR, Ferrell ST, Swanson WF. 2007. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous *in vitro* fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Reprod Fert Dev* 19: 685-694.
- Sunquist M, Sunquist F. 2002. Wild Cats of the World. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Swanson WF 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Leopardus pardalis*). *J Reprod Fert* 106: 67-94.
- Swanson WF. 2003. Research in non-domestic species: Experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. *ILAR* 44: 307-316.
- Swanson WF. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66: 49-58.
- Swanson WF, Browns JL, Wildt DE. 1996a. Influence of seasonality on reproductive traits of the male Pallas'cat (*Felis manul*) and implications for captive management. *J Zoo Wildl Med* 1996: 234-240.
- Swanson WF, Howard JG, Roth TL, Brown JL, Alvarado T, Burton M, Stames D, Wildt DE. 1996b. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotropins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Leopardus pardalis*). *J Reprod Fert* 106: 87-94.
- Swanson WF, Johnson WE, Cambre RC, Citino SB, Quigley KB, Brousset DM, Morais RN, Moreira N, O'Brien SJ, Wildt DE. 2003. Reproductive Status of Endemic Felid Species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. *Zoo Biol* 22: 421-441.
- Swanson WF, Maggs DJ, Clarke HE, Newell AE, Bond JB, Bateman HL, Kennedy-Stoskopf S. 2006. Assessment of viral presence in semen and reproductive function of frozen-thawed spermatozoa from Pallas' cats (*Otocolobus manul*) infected with feline herpesvirus. *J Zoo Wildl Med* 37: 336-346.
- Swanson WF, McRae MA, Bond JB, Melniczek JR, Haskins ME. 2000. Production of mucopolysaccharidosis - homozygous and heterozygous kittens following transfer of frozen thawed IVF embryos. *Biol. Reprod. Suppl* 62: 319.
- Swanson WF, Roth TL, Citino SB, Kenny D, Wildt DE. 1996c. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology* 45: 241.
- Swanson WF, Stoops MA, Magarey GM, Herrick JR 2007. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. En: *Spermatology*. Roldan ERS y Gomendio M (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 417-432.
- Swanson WF, Wildt DE. 1997. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *Int Zoo Yrbk* 35: 152-159.
- Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. 2000. *In vitro* fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 63: 1774-1780.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D and Lopes MD. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1629-1632.
- Temminck CJ. 1824. Monographies de mammalogie. Paris: D'Ocagne and Chez G. Dufour
- Thibier M, Guerin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 233-251.
- Thiangtum K, Swanson W, Howard JG, Tunwattana W, Tongthainam D, Wichasilpa W, Patumrattanathan P, Pinyopoommintr T. 2006. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilisation in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod Fert Dev* 18: 373-382.

- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 1999. Sources of variation in boar spermatozoa fertility following cryopreservation. *Cryobiology* 39: 355.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axner E. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70: 233-240.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66: 1637-1640.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkiná AM, Ekhlasí-Hundrieser M. 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61: 653-662.
- Tsutsui T. 2006. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology* 66:122-125.
- Tsutsui T, Kuwabara S, Kuwabara K, Fugota Y, Finjo T, Hori T. 2004. Development of spermatogenic function in the sex maturation process in male cats. *J Vet Med Sci* 66: 1125-1127.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. 2000. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci* 62:1247-51.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. 2002. Artificial Insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci* 65: 397-399.
- Ulrey DE, Bernard JB. 1989. Meat diets for performing exotic cats. *J Zoo Wildl Med* 20: 20-25.
- Valverde JA. 1963. Información sobre el Lince Español. Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza, Madrid.
- Vargas A, Sánchez I, Godoy J, Roldán E, Martínez F, Simón MA, Delibes M (Eds.). 2007. Plan de Acción para la Cría en Cautividad del Lince Ibérico: Cuarta edición. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Vargas A, Sánchez I, Martínez F, Godoy JA, Roldán E, Simón MA, Serra R, Pérez MJ, Enseñat C, Delibes M, Aymerich M, Sliwa A, Breitenmoser U. 2008. The Iberian lynx *Lynx pardinus* Conservation Breeding Program. *Int Zoo Yb* 42: 190-198.
- Vila L, García J. 1983. Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol* 5: 135-142.
- Villaverde AI, Melo CM, Martín I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. 2008. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*) Artificial insemination in domestic cats. *Anim Reprod Sci*. En prensa.
- Villaverde AI, Martins MI, Castro VB, Lopes MD. 2006. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* 66: 1641-1644.
- Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131: 887-894.
- Watson PF. 1976. Electroejaculation, semen characteristics and semen preservation of the brindled gnu. *J Reprod Fert* 47: 123-126.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. En: Oxford Rev Reprod Biol Vol. I. Finn CA (Ed), Oxford University Press, Oxford (UK), pp. 283-351.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. En: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Morris GJ, Clarke A (Eds.). Academic Press. London. pp. 189-218.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Marshall's Physiology of Reproduction, Vol. 2. Lamming GE (Ed.), Churchill Livingstone, London. pp. 748-869.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
- Watson P, Anderson W. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fert* 69: 229-235.
- Werdlin L. 1981. The evolution of lynxes. *Ann Zool Fenici* 18: 37-71.
- Wildt DE. 1990. Potential applications of IVF technology for species conservation. En: Fertilization in Mammals. Bavister BD, Cummins JM, Roldan ERS (Eds.). Serono Symposia, Norwell MA. pp. 339-364.
- Wildt DE. 1991. Fertilization in cats. En: A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Dunbar BS (Ed.). Plenum Press. New York. pp. 299-328.
- Wildt DE. 1994. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. En: Function of Somatic Cells in the Testes. Bartke A (Ed), Springer-Verlag, New York, pp. 1-24.
- Wildt DE, Brown JL, Bush M, Barone MA, Cooper KA, Grisham J, Howard JG. 1993. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in North American zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biol* 12: 45-80.

- Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. 1987a. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329: 328-331.
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. 1983. Unique seminal quality in the south African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod* 29: 1019-1025.
- Wildt DE, Howard JG, Hall LL, Bush M. 1986a. Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electroejaculates contain high proportion of pleomorphic spermatozoa throughout the year. *Biol Reprod* 34: 937-947.
- Wildt DE, O'Brien SJ, Howard JG, Caro TM, Roelke ME, Brown JL, Bush M. 1987b. Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biol Reprod* 36: 351-360.
- Wildt DE, Pukazhenthi B, Brown J, Monfort S, Howard JG, Roth T. 1995. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fert Dev* 7: 811-824.
- Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL, Seal US. 1997. Genome Resource Banks. Living collections for biodiversity conservation. *BioScience* 47: 689-698.
- Wildt DE, Schiewe MC, Schmidt PM, Goodrowe KL, Howard JG, Phillips LG, O'Brien SJ, and Bush M. 1986b. Developing animals models system for embryo technologies in rare and endangered wildlife. *Theriogenology* 25: 33-51.
- Wilson EO 1992. *The Diversity of Life*. Penguin books. London.
- Wilson EO. 2002. *The Future of Life*. Abacus. London.
- Yamagimachi R. 1972. Penetration of guinea pig spermatozoa into hamster egg *in vitro*. *J Reprod Fert* 28: 477-480.
- Yamagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds.). Raven Press, New York. pp. 189-317.
- Yu I, Leibo SP. 2002. Recovery the motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57: 1179-1190.
- Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.
- Zalata A, Hafez T, Comhaire F. 1995. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 10: 1444-1451.
- Zambelli D, Canappele B, Castagnetti C, Belluzzi S. 2002. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Dom Anim* 37: 310-313.
- Zambelli D, Cunto M. 2006. Semen collection in cats: Techniques and analysis, semen collection and evaluation in cats. *Theriogenology* 66: 159-165.
- Zambelli D, Cunto M, Prati F, Merlo B. 2007. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 68: 796-803.
- Zambelli D, Merlo B, Iacono E, Prati F, Belluzzi S. 2006. Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 41:137-41.
- Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. 2008. Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* 69:485-90.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martínez H. 1998. Semen characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl* 21: 207-216.

Anexo I

Refrigeración de espermatozoides mediante un procedimiento automático



Para realizar una refrigeración controlada y fiable de la suspensión espermática hemos explorado la posibilidad de utilizar un procedimiento automático con un bloque térmico programable (ThermoStat plus 5352, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y una cámara seca (CombiBox, Eppendorf) ajustada al mismo. El bloque seco tiene un control de temperatura que le permite variar entre -5°C y 99°C. Tanto la temperatura como el tiempo pueden programarse individualmente, permitiendo establecer 4 niveles de temperatura y 4 tiempos consecutivos. De este modo, el tiempo transcurrido para la transición lineal entre dos temperaturas puede programarse individualmente y así, por pasos, se determina la curva de descenso de temperatura (en °C/min).

Se hicieron pruebas de refrigeración, desde 20°C hasta 5°C durante 120 min, con el bloque programable. En el interior de la cámara seca se dispuso una gradilla para microtubos donde se colocó un criovial de 5 ml con pajuelas cortadas y cargadas con 50 µl de diluyente de congelación y una alícuota de diluyente en un microtubo que simulaba la muestra de semen diluido para evaluación post-refrigeración. Se utilizó un termómetro digital externo con dos sondas para hacer un seguimiento de la temperatura en el interior de la cámara. Una sonda se colocó dentro de la cámara, apoyada en la gradilla y la otra dentro del criovial de 5 ml junto a las pajuelas cargada sólo con criodiluyente (Fig. 1).

Las pruebas iniciales revelaron que la temperatura real dentro de la cámara CombiBox, medida por el termómetro digital externo, era diferente de la que se indicaba en el panel de control del bloque seco, medida por el termómetro incorporado en la máquina (probablemente debido al lento enfriamiento por convección dentro de la cámara CombiBox). Por este motivo se examinaron una serie de opciones para identificar el programa que mejor permitiera obtener la temperatura final deseada (5°C) dentro de la cámara. La temperatura inicial se fijó siempre en 20°C y, para compensar las variaciones en la temperatura ambiente entre distintos lugares de trabajo, el bloque seco se dejó funcionando a esta temperatura antes de introducir las muestras. Una vez que el vial que contenía las pajuelas se introdujo en la cámara, se programó siempre un periodo de 5 min a 20°C para permitir el equilibrado a esta temperatura. Basándonos en pruebas preliminares se seleccionaron tres temperaturas finales (0°C, -1°C y -2°C) en el bloque seco con el objetivo de alcanzar 5 °C dentro de la cámara al final del periodo de refrigeración (120 min). La temperatura real se registró cada 10 min durante los 120 min. Se realizaron al menos 3 repeticiones para cada temperatura final elegida. La Figura 2 muestra las curvas de descenso de temperatura durante 120 min con las tres temperaturas establecidas en el bloque seco. Se encontró que la temperatura final de 5°C se alcanzó dentro de la cámara cuando el bloque seco fue programado con una temperatura diana de -1°C. Para todos los experimentos subsiguientes de criopreservación de espermatozoides de linco ibérico, se utilizó esta temperatura diana.

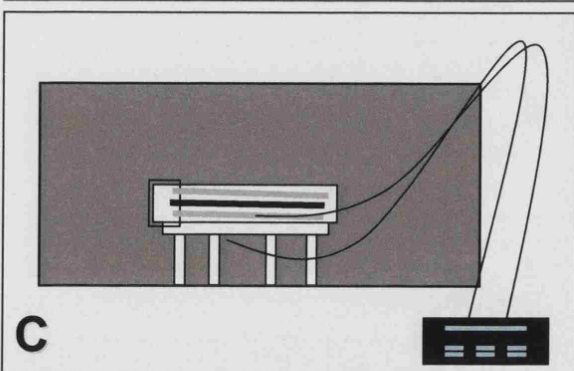
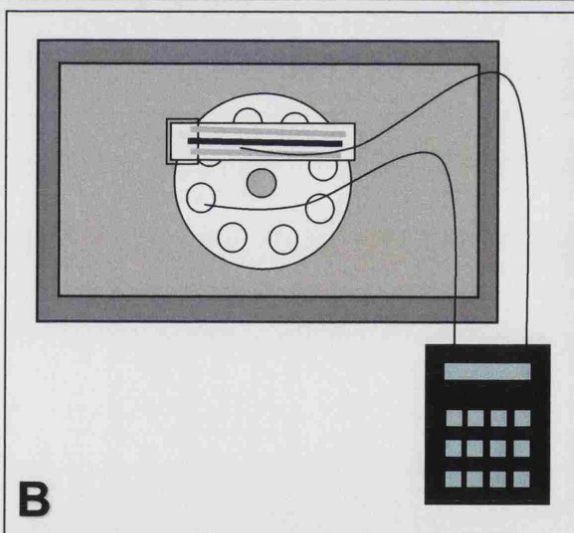
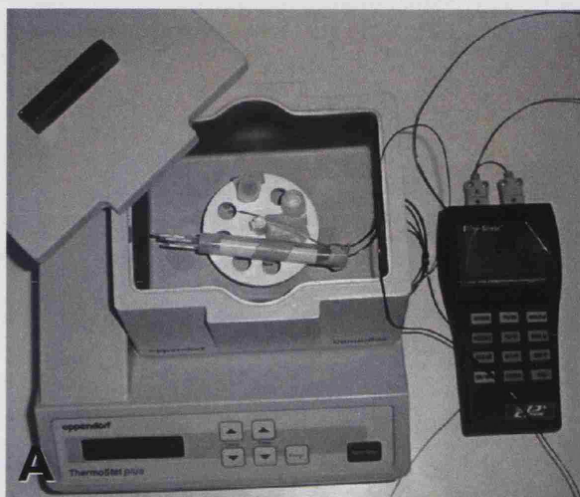


Fig. 1. Refrigeración de muestras de semen en un bloque seco programable con una cámara a medida del bloque térmico. (A) El bloque térmico (ThermoStat plus, Eppendorf) con la cámara (CombiBox) usada para la refrigeración de las muestras de semen se integra con un termómetro digital externo de dos sondas que permite seguir la temperatura en la cámara y dentro de una pajuela rellena con criodiluyente. Las pajuelas se pusieron dentro de un criovial de 5 ml que se colocó sobre una gradilla; la submuestra resuspendida en criodiluyente y contenida en el microtubo colocado también en la gradilla se evalúa al final de la refrigeración. (B, C) Diagrama de la vista en planta y lateral mostrando las pajuelas dentro del criovial y sobre la gradilla, y sondas del termómetro digital para monitorizar los cambios de temperatura.

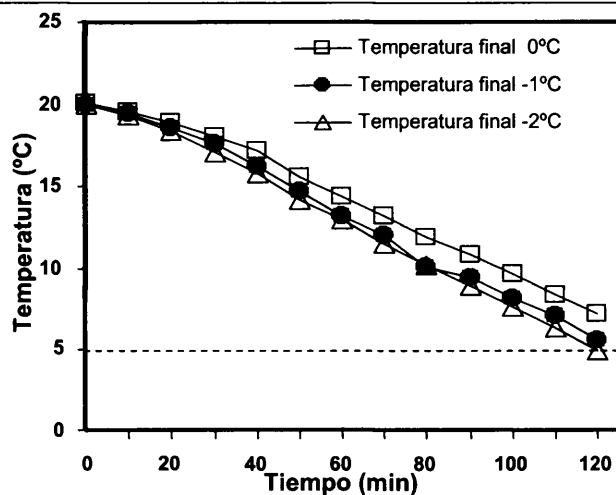


Fig. 2. Curvas de refrigeración obtenidas con un bloque térmico programable con una cámara a medida (ThermoStat plus y CombiBox, Eppendorf). Las tres curvas ilustran los valores de temperatura dentro de una pajueta con criodiluyente, colocada dentro de la cámara, cuando la temperatura final programada fue (0°C, -1°C y -2°C) al final de cada ciclo de 120 min. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se seleccionó como temperatura final -1°C ya que ello permite alcanzar la temperatura final de 5°C dentro de la pajueta y la cámara.

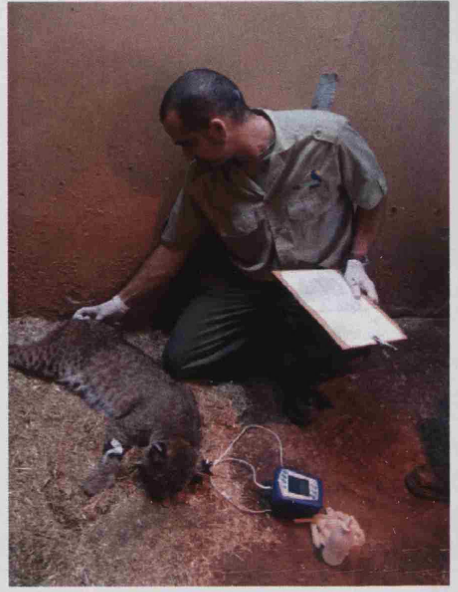
Dado que el bloque térmico ofrece la posibilidad de seleccionar diferentes programas con varias temperaturas y tiempos para alcanzarlas, en el futuro se podrían explorar otras curvas de refrigeración y el establecimiento de un tiempo de equilibrado adicional antes de llevar las muestras a congelar.

Se considera que este sistema es más conveniente y fiable que los métodos tradicionales de refrigeración utilizando frigoríficos o contenedores llenos de agua en los que la temperatura va bajando por el añadido de cubitos de hielo o hielo seco.

Anexo II

Fotos



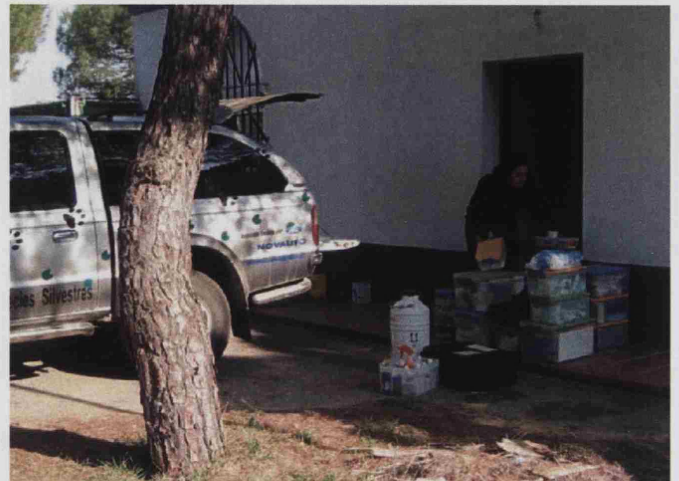


Macho de lince rojo. Captura y anestesia en el Zoobotánico Jerez.

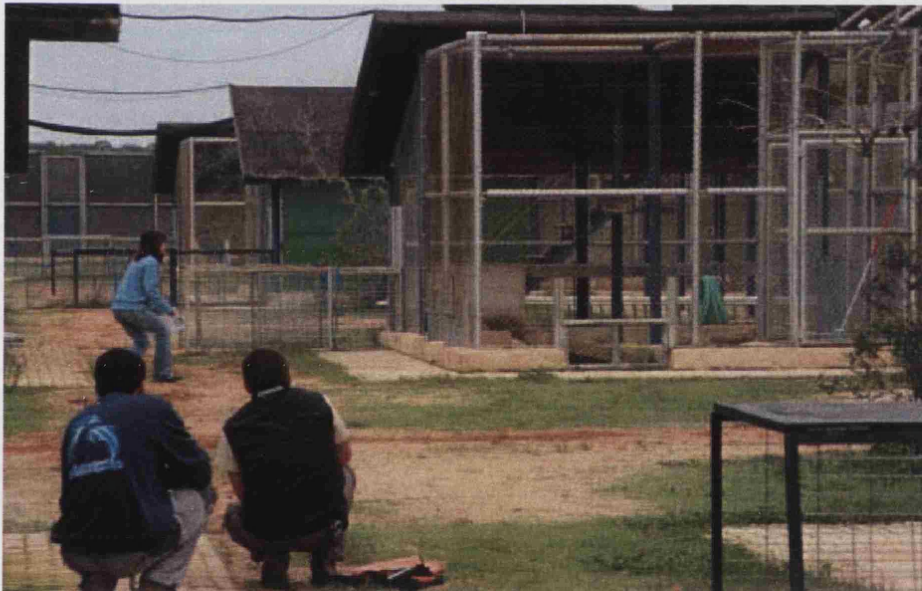


Quirófano y electroeyaculación de lince rojo en el Zoobotánico Jerez (Jordi Colas ©).



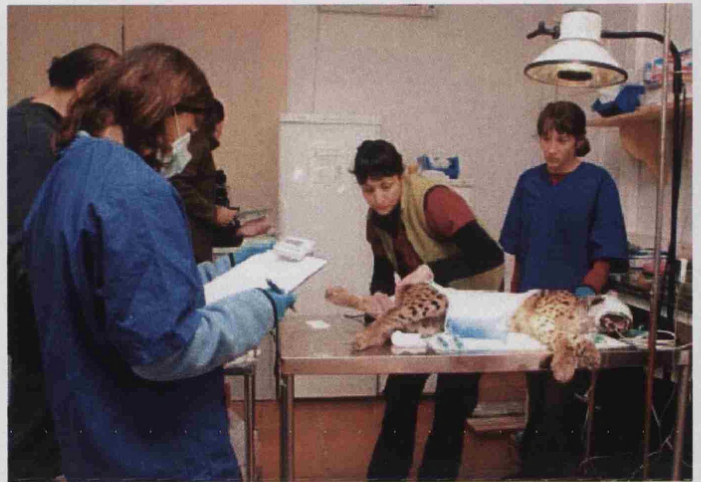
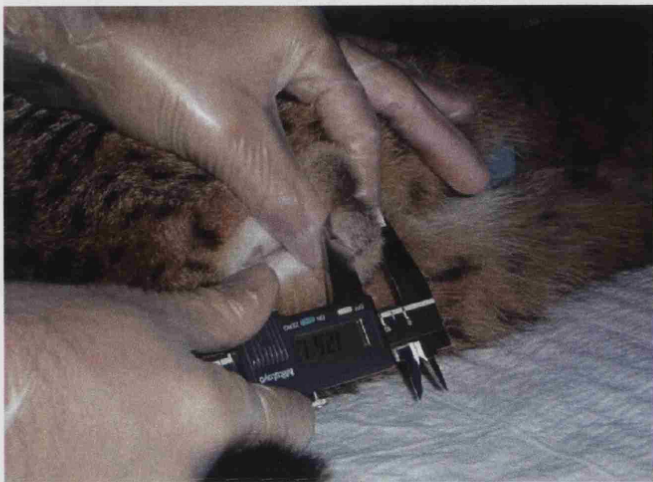


Primer coche cedido por Novauto para el trabajo de campo y laboratorio móvil en Doñana.

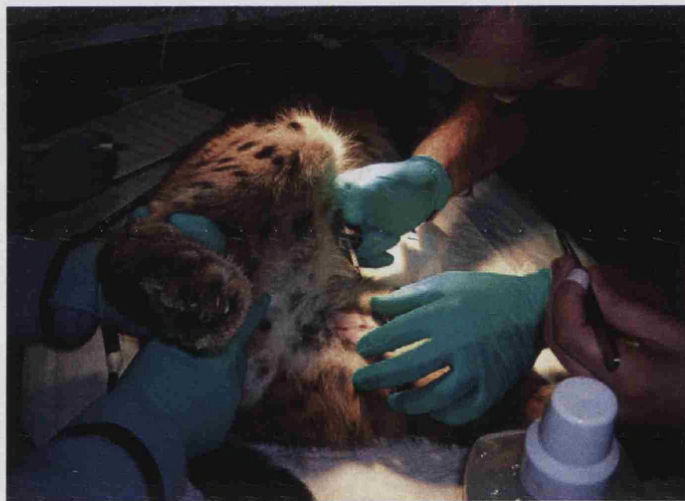


Anestesia y traslado de lince ibérico en el Centro de Cría de Lince Ibérico "El Acebuche".
(Programa de Conservación *Ex-situ* del Lince Ibérico ©).





Medida de testículos y electroeyaculación de un lince ibérico en el Centro de Cría de Lince Ibérico "El Acebuche".



Toma de biopsia de piel de un lince ibérico y primera camada de lince ibérico nacida en cautividad en 2005 en el Centro de Cría de Lince Ibérico "El Acebuche" (Programa de Conservación *Ex-situ* del Lince Ibérico ©).



Machos de lince ibérico de las poblaciones de Doñana y Sierra Morena en el Centro de Cría de Lince Ibérico de "El Acebuche" (Programa de Conservación *Ex-situ* del Lince Ibérico ©).



Hábitat del lince ibérico en Doñana. Pista de acceso a la Reserva Biológica de Doñana con señales de tráfico para control de velocidad y cercado de alimentación suplementaria de conejo como medidas de conservación *ex-situ* en Doñana .



Anestesia y electroeyaculación de lince ibérico de vida libre de la población de Doñana en Diciembre de 2006.



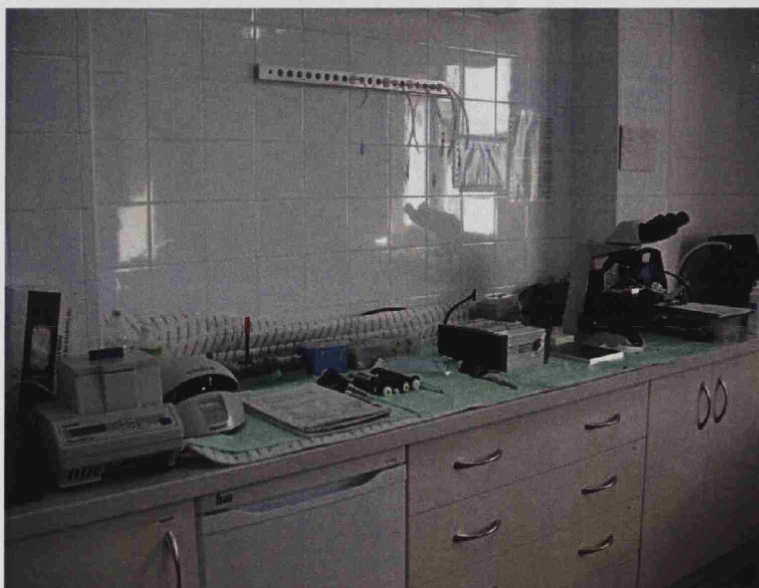
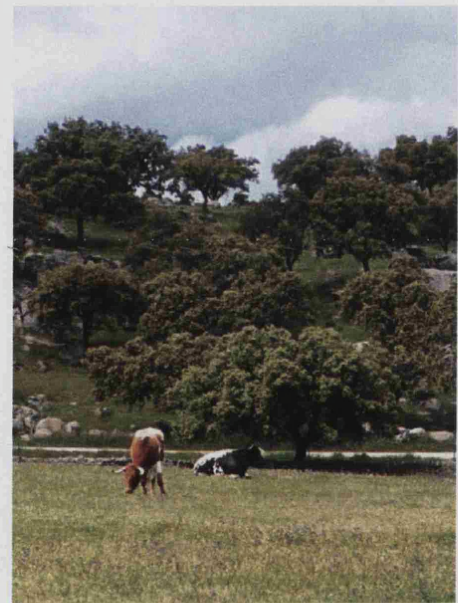
Liberación de lince ibérico post-chequeo en Doñana.



Señales de tráfico para control de velocidad como medida de conservación *ex-situ* en Andújar



Hábitat del lince ibérico en Sierra Morena Oriental.



Equipo para la evaluación y criopreservación de semen (izquierda) y electroeyaculación (derecha) en el centro de cría de lince ibérico de "La Aliseda".

Anexo III

Publicaciones



Los capítulos de esta tesis han dado origen a las siguientes publicaciones científicas enviadas o a enviar a revistas incluidas en el Science Citation Index (SCI) del Institute for Scientific Information (ISI):

Capítulo 1: Factores que afectan al éxito de la congelación de espermatozoides epididimarios de gato doméstico (*Felis catus*).

(1) Gañan N, Gomendio M, Roldan ERS. Sperm traits in domestic cat (*Felis catus*). Circannual variations and correlates of sperm parameters (en preparación para ser enviado a publicar).

(2) Gañan N, González R, Gomendio M, Roldan ERS. Effect of diluents and time of glycerol addition on cryopreservation and sperm preparation for *in vitro* fertilization in domestic cat (*Felis catus*) epididymal spermatozoa (en preparación para ser enviado a publicar).

(3) Gañan N, Gomendio M, Roldan ERS. Factors affecting cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) epididymal spermatozoa (en preparación para ser enviado a publicar).

Capítulo 2: Efecto del almacenamiento de epidídimos de gato doméstico (*Felis catus*) a 5°C sobre la calidad y la criopreservación espermática.

(4) Gañan N, Gomendio M, Roldan ERS. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* (enviado/en revisión).

Capítulo 3: Características reproductivas del macho, criopreservación de semen y fecundación *in vitro* heteróloga en el lince rojo (*Lynx rufus*).

(5) Gañan N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sánchez I, Aguilar JM, Gomendio M, Roldan ERS. 2009. Male reproductive traits, semen cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology* 72, 341–352.

Capítulo 4: Rasgos reproductivos del macho de lince ibérico (*Lynx pardinus*).

(6) Gañan N, Sestelo A, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Sánchez I, Pérez-Aspa MJ, Palomares F, Gomendio M, Roldan ERS. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* (enviado/en revisión).

Capítulo 5: Calidad del semen, Criopreservación de espermatozoides y fecundación *in vitro* heteróloga en el lince ibérico (*Lynx pardinus*).

(7) Gañan N, González R, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Gomendio M, Roldan ERS. 2009. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilisation in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, en prensa.